

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



TRẦN THỊ NGỌC ANH

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG STEROID NIỆU
BẰNG GC/MS TRONG CHẨN ĐOÁN RỐI LOẠN
SINH TỔNG HỢP STEROID BẨM SINH Ở TRẺ EM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2019

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

TRẦN THỊ NGỌC ANH

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG STEROID NIỆU
BẰNG GC/MS TRONG CHẨN ĐOÁN RỐI LOẠN
SINH TỔNG HỢP STEROID BẨM SINH Ở TRẺ EM**

Chuyên ngành : Hóa sinh Y học

Mã số : 62720112

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Trần Thị Chi Mai
2. PGS.TS. Trần Minh Điền

HÀ NỘI – 2019

LỜI CẢM ƠN

Xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc Bệnh viện Hữu Nghị Việt Đức, Ban Giám đốc Bệnh viện Nhi Trung ương, Ban Giám hiệu Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để em hoàn thành khóa học nghiên cứu sinh và bảo vệ luận án tiến sỹ.

Em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Trần Thị Chi Mai, PGS.TS Trần Minh Điền, những người thầy đã tận tình hướng dẫn, chỉnh sửa luận án, giúp đỡ và động viên em trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu, hoàn thành luận án.

Xin trân trọng cảm ơn các thầy cô Bộ môn Hóa Sinh-Trường Đại học Y Hà Nội, đã hướng dẫn, giảng dạy và đóng góp nhiều ý kiến quý báu để em hoàn thành luận án. Xin cảm ơn Phòng Quản lý Đào tạo Sau Đại học, các phòng ban trong nhà trường đã tạo điều kiện và giúp đỡ em hoàn thành quá trình học tập tại trường.

Xin gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp tại khoa Xét nghiệm Huyết học – Bệnh viện Hữu Nghị Việt Đức, các anh –chị khoa Hóa sinh và khoa Nội tiết – Chuyển hóa – Di truyền Bệnh viện Nhi trung ương đã hỗ trợ tôi rất nhiều trong công việc, lấy mẫu và thực hiện kỹ thuật để tôi hoàn thành luận án.

Xin cảm ơn gia đình, bạn bè đã động viên, giúp đỡ, chia sẻ trong cuộc sống và trong công việc, giúp tôi hoàn thành khóa học.

Xin cảm ơn tất cả người bệnh, các bé khỏe mạnh đã cung cấp mẫu bệnh phẩm để thực hiện đề tài nghiên cứu này.

Xin trân trọng cảm ơn!

Ngày 17 tháng 7 năm 2019

NCS. Trần Thị Ngọc Anh

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Trần Thị Ngọc Anh, nghiên cứu sinh khóa 34, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh y học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Tiến sĩ Trần Thị Chi Mai và Phó giáo sư- Tiến sĩ Trần Minh Điền, Phó Giám đốc Bệnh viện Nhi Trung ương.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam. Nghiên cứu định lượng steroid niệu bằng kỹ thuật sắc ký khí – khối phổ có giá trị trong chẩn đoán bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid bẩm sinh ở trẻ em, được thực hiện lần đầu tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận, chấp thuận của cơ sở nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày 17 tháng 7 năm 2019

NCS. Trần Thị Ngọc Anh

CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase	
5 α -DHT	5 α -Dihydrotestosterone	
5 α -THF	5 α -Tetrahydrocortisol	
11OH An	11-Hydroxy androsterone	
11OH Et	11-Hydroxy etiocholanolone	
11 β -OH	11 β -Hydroxylase	
11 Keto An	11-Ketoandrosterone	
17 β -HSD	17 β - Hydroxysteroid dehydrogenase	
17-OHP	17 α -Hydroxyprogesterone	
17OHPN	17-Hydroxypregnanolone	
21-OH	21-Hydroxylase	
A ³	Androstenetriol	
ACTH	Adrenocorticotropic hormone	Hormon kích thượng thận
ADN	Acid deoxyribonucleic	
AME	Apparent mineralocorticoid excess	
An	Androsterone	
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute	Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm
CMO	Corticosterone methyl oxidase	
CXD		Chưa xác định
CV	Coefficient variation	Hệ số biến thiên
DHEA	Dehydroepiandrosterone	
DOC	Deoxycorticosterone	
EQA	External qualificative assurance	Ngoại kiểm chất lượng
Et	Etiocholanolone	
FSH	Follice stimulating hormone	Hormon kích noãn tố

GC/MS	Gas chromatography – mass spectrometry	Sắc ký khí – khối phổ
GnRH	Gonadotropin releasing hormone	Hormon giải phóng gonadotropin
hCG	Human chorionic gonadotropin	
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine	Hiệp hội Hóa sinh lâm sàng và Phòng xét nghiệm y học Quốc tế
KXĐ		Không xác định
LC/MS-MS	Liquid chromatography-Tandem mass spectrometry	Sắc ký lỏng- khối phổ kép
LH	Luteinizing hormone	Hormon kích hoàng thể
PD	Pregnanediol	
POR	Cytochrome P450 oxidoreductase	
PT	Pregnanetriol	
PTL	Pregnanetriolone	
QC	Quality control	Nội kiểm chất lượng
RLPTGT	Disorders of sex development	Rối loạn phát triển giới tính
SD	Standard deviation	Độ lệch chuẩn
SIM	Selected ion monitoring	Ion theo dõi chọn lọc
SHBG	Sex hormone binding globulin	Globulin gắn hormon sinh dục
StAR	Steroid acute response protein	Protein đáp ứng cấp với steroid
THA	Tetrahydroaldosterone	
THB	Tetrahydrocorticosterone	
THE	Tetrahydrocortisone	
THF	Tetrahydrocortisol	
THS	Tetrahydro 11-deoxycortisol	
TMSI	N-trimethylsilylimidazole	
TSTTBS	Congenital adrenal hyperplasia	Tăng sản thượng thận bẩm sinh

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Kỹ thuật sắc ký khí - khối phổ	3
1.1.1. Nguyên lý chung của kỹ thuật sắc ký	3
1.1.2. Sắc ký khí – khối phổ	3
1.2. Thẩm định phương pháp và thiết lập khoảng tham chiếu.....	9
1.2.1. Thẩm định phương pháp	9
1.2.2. Thiết lập khoảng tham chiếu	13
1.3. Sinh tổng hợp hormon steroid và bệnh rối loạn tổng hợp steroid bẩm sinh. 16	
1.3.1. Tổng hợp hormon steroid.....	16
1.3.2. Bệnh lý rối loạn tổng hợp hormon steroid bẩm sinh.....	18
1.3.3. Ứng dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS trong chẩn đoán rối loạn tổng hợp hormon steroid bẩm sinh.....	31
1.3.4. Một số kỹ thuật khác sử dụng trong chẩn đoán rối loạn tổng hợp hormon steroid.....	38
1.4. Nghiên cứu về rối loạn tổng hợp hormon steroid bẩm sinh ở Việt Nam . 41	
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	43
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	43
2.1.1. Nhóm chứng.....	43
2.1.2. Nhóm bệnh	44
2.2. Trang bị, hoá chất và chất liệu nghiên cứu	45
2.2.1. Trang thiết bị	45
2.2.2. Hoá chất và vật tư tiêu hao	46
2.2.3. Chất liệu nghiên cứu	49
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	49
2.3.1. Thẩm định kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS	49
2.3.2. Thiết lập khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ em	53
2.3.3. Chẩn đoán rối loạn tổng hợp steroid ở trẻ em.....	54

2.4. Phân tích và xử lý số liệu	57
2.5. Đạo đức y học	58
Chương 3: KẾT QUẢ	59
3.1. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng steroid niệu	59
3.1.1. Giới hạn định lượng và độ thu hồi	59
3.1.2. Độ lặp và độ tái lặp.....	60
3.1.3. Kết quả ngoại kiểm steroid niệu	62
3.2. Khoảng tham chiếu các steroid niệu ở trẻ em	66
3.2.1. Sự phân bố các steroid niệu	66
3.2.2. Khoảng tham chiếu nồng độ các steroid niệu	67
3.2.3. Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán	74
3.3. Chẩn đoán rối loạn tổng hợp hormon steroid.....	79
3.3.1. Đặc điểm nhóm bệnh	79
3.3.2. Đặc điểm người bệnh thiếu 21-OH chưa điều trị.....	80
3.3.3. Thiếu 11 β -OH chưa điều trị.....	88
3.3.4. Thiếu 5 α -reductase type 2:.....	91
3.3.5. Thiếu 3 β -HSD II.....	95
3.3.6. Đặc điểm nhóm đã điều trị.....	100
3.3.7. Đặc điểm nhóm chưa xác định.....	103
Chương 4: BÀN LUẬN	105
4.1. Kết quả thẩm định kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS....	106
4.2. Khoảng tham chiếu các sản phẩm steroid niệu ở trẻ em	108
4.3. Kết quả steroid niệu ở người bệnh rối loạn tổng hợp hormon steroid 117	
4.4. Ứng dụng định lượng steroid trong chẩn đoán ở người bệnh nghi mắc TSTTBS đã điều trị hormon thay thế.....	129
4.5. Kết quả định lượng steroid niệu ở các trường hợp chưa xác định	131
KẾT LUẬN	134
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1 Một số sản phẩm chuyển hóa steroid niệu	8
Bảng 2.1: Các sản phẩm steroid niệu được định lượng	48
Bảng 2.2: Cách thức tiến hành định lượng steroid niệu.....	51
Bảng 2.3: Một số tỷ lệ chẩn đoán thường dùng.....	57
Bảng 3.1: Giới hạn định lượng và độ thu hồi của các steroid niệu	59
Bảng 3.2: Độ lặp lại của các steroid niệu.....	60
Bảng 3.3: Độ tái lập của các steroid niệu.....	61
Bảng 3.4. Mối tương quan kết quả phòng xét nghiệm với ngoại kiểm	63
Bảng 3.5. Phân bố độ tuổi và giới tính nhóm chứng	66
Bảng 3.6. So sánh nồng độ steroid niệu giữa các nhóm tuổi	67
Bảng 3.7. Khoảng tham chiếu steroid niệu ở trẻ sơ sinh	70
Bảng 3.8. Khoảng tham chiếu steroid niệu của trẻ 1 tháng - < 2 tuổi.....	71
Bảng 3.9. Khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ 2 - < 8 tuổi	72
Bảng 3.10. Khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ 8-≤11 tuổi	73
Bảng 3.11. So sánh tỷ lệ chẩn đoán giữa các nhóm tuổi	74
Bảng 3.12. Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán cho trẻ sơ sinh	75
Bảng 3.13. Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán cho trẻ 1 tháng-<2 tuổi	76
Bảng 3.14. Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán cho trẻ 2-<8 tuổi.....	77
Bảng 3.15. Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán cho trẻ 8-≤11 tuổi.....	78
Bảng 3.16. Đặc điểm của nhóm bệnh	79
Bảng 3.17. Phân loại chẩn đoán rối loạn tổng hợp steroid theo tuổi.....	79
Bảng 3.18. Đặc điểm nhóm chưa điều trị.....	80
Bảng 3.19. So sánh nồng độ steroid niệu nhóm thiếu 21-OH với nhóm chứng ...	81
Bảng 3.20. Đặc điểm steroid niệu và tỷ lệ chẩn đoán của nhóm thiếu 21-OH	82
Bảng 3.21. Các chỉ số cận lâm sàng của nhóm thiếu 21-OH.....	82
Bảng 3.22. Giá trị chẩn đoán thiếu 21-OH của một số thông số.....	87

Bảng 3.23. Đặc điểm người bệnh thiếu 11β -OH	88
Bảng 3.24. Giá trị chẩn đoán thiếu 11β -OH của một số thông số.....	90
Bảng 3.25. Kết quả steroid niệu ở người bệnh thiếu 5α -reductase type 2.....	91
Bảng 3.26. Đặc điểm người bệnh thiếu 5α -reductase type 2	92
Bảng 3.27. Giá trị chẩn đoán thiếu 5α -reductase type 2 của một số tỷ lệ	95
Bảng 3.28. Kết quả steroid niệu ở người bệnh nghi thiếu 3β -HSD II.....	95
Bảng 3.29. Tỷ lệ chẩn đoán ở người bệnh thiếu 3β -HSD II	97
Bảng 3.30. Nồng độ các hormon ở người bệnh nghi thiếu 3β -HSD II	97
Bảng 3.31. Đặc điểm người bệnh thiếu 21-OH đã điều trị	100
Bảng 3.32. Steroid niệu ở người bệnh thiếu 21-OH đã điều trị	101
Bảng 3.33. So sánh steroid niệu ở nhóm thiếu 21-OH đã điều trị	102
Bảng 3.34. Đặc điểm steroid niệu nhóm chưa xác định	104

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1: Kết quả ngoại kiểm	62
Biểu đồ 3.2. Tương quan kết quả An	64
Biểu đồ 3.3. Tương quan kết quả PT	64
Biểu đồ 3.4. Sự tương đồng kết quả Et	65
Biểu đồ 3.5. Sự tương đồng kết quả DHEA.....	65
Biểu đồ 3.6. Sự phân bố nồng độ An ở trẻ nam 8-≤11 tuổi.....	66
Biểu đồ 3.7. Nồng độ Cortolone và Cortol theo tuổi.....	68
Biểu đồ 3.8. Nồng độ An, Et, DHEA, 11Keto An theo tuổi.....	68
Biểu đồ 3.9. Nồng độ 11OH An, 11OH Et, PD, PT theo tuổi	69
Biểu đồ 3.10. Nồng độ A'3, THE, THF, 5α-THF theo tuổi	69
Biểu đồ 3.11. Sắc ký đồ toàn thể của mẫu chuẩn	83
Biểu đồ 3.12. Sắc ký đồ người bệnh thiếu 21-OH.....	84
Biểu đồ 3.13. Mẫu ion đặc hiệu của 17-OHPN.....	84
Biểu đồ 3.14. Mẫu ion đặc hiệu cho PTL	85
Biểu đồ 3.15. So sánh nồng độ PT giữa các nhóm.....	85
Biểu đồ 3.16. So sánh tỷ lệ PT/(THE + THF +5α-THF) giữa các nhóm	86
Biểu đồ 3.17. Biểu đồ ROC cho nồng độ PT	86
Biểu đồ 3.18. Biểu đồ ROC cho tỷ lệ PT/(THE +THF +5α-THF)	87
Biểu đồ 3.19. Sắc ký đồ người bệnh thiếu 11β-OH.....	89
Biểu đồ 3.20. So sánh nồng độ THS giữa các nhóm	89
Biểu đồ 3.21. So sánh tỷ lệ THS/(THE+THF+5α-THF) giữa các nhóm	90
Biểu đồ 3.22. Sắc ký đồ toàn thể mẫu thiếu 5α-reductase type 2	93
Biểu đồ 3.23. Sắc ký đồ mẫu bình thường	94
Biểu đồ 3.24. Sắc ký đồ mẫu thiếu 5α-reductase type 2.....	94
Biểu đồ 3.25. Tỷ lệ THF/5α-THF ở các nhóm.....	94

Biểu đồ 3.26. Sắc ký đồ mẫu thiếu 3β -HSD II.....	98
Biểu đồ 3.27. Mẫu ion đặc hiệu cho DHEA.....	98
Biểu đồ 3.28. So sánh nồng độ DHEA giữa các nhóm.....	99
Biểu đồ 3.29. So sánh tỷ lệ DHEA/(THE+THF+ 5α -THF) giữa các nhóm....	99
Biểu đồ 3.30. Thời điểm lấy mẫu của người bệnh thiếu 21-OH.....	101

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu tạo hệ thống sắc ký khí khối phổ	4
Hình 1.2. Sơ đồ sinh tổng hợp các hormon steroid	17
Hình 2.1. Hệ thống sắc ký khí – khối phổ Agilent	46
Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu	55

ĐẶT VẤN ĐỀ

Rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid bẩm sinh là bệnh lý tuyến vỏ thượng thận, giảm tổng hợp một hoặc nhiều hormon vỏ thượng thận do thiếu một phần hoặc hoàn toàn hoạt tính của enzym xúc tác phản ứng tổng hợp hormon steroid. Trong nhóm này, một số bệnh thường gặp là thiếu enzym 21-hydroxylase (21-OH), thiếu 11 β -hydroxylase (11 β -OH), thiếu 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II (3 β -HSD II), thiếu 5 α -reductase type 2. Giảm hoặc mất hoạt tính các enzym khác như 17 α -hydroxylase/17,20-lyase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17 β -HSD type 3), 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, corticosterone methyl oxidase II (CMO II) và aromatase gây rối loạn tổng hợp hormon steroid bẩm sinh rất hiếm gặp [1],[2].

Rối loạn tổng hợp hormon steroid bẩm sinh gây tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS), rối loạn nước – điện giải (RLĐG), rối loạn phát triển giới tính (RLPTGT) mà hậu quả có thể dẫn đến tử vong do suy tuyến thượng thận. Chẩn đoán sớm các bệnh lý rối loạn tổng hợp hormon steroid và điều trị kịp thời bằng hormon thay thế sẽ đem lại hiệu quả cao, hạn chế biến chứng và giảm tỷ lệ tử vong do suy tuyến thượng thận [3]. Sàng lọc TSTTBS trước đây được thực hiện dựa trên định lượng hormon steroid và tiền chất trong máu bằng kỹ thuật miễn dịch cho trẻ sơ sinh [4],[5]. Ngày nay, kỹ thuật sắc ký lỏng - khối phổ (liquid chromatography tandem mass spectrometry: LC/MS-MS) rất hữu ích trong sàng lọc TSTTBS và ưu việt hơn kỹ thuật miễn dịch [6]. Chẩn đoán TSTTBS dựa trên kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng sắc ký khí – khối phổ (gas chromatography-mass spectrometry: GC/MS) [7],[8]; khẳng định chẩn đoán bằng phân tích đột biến gen tương ứng [9],[10]. Trong đó, định lượng các steroid niệu bằng GC/MS là tiêu chuẩn quan trọng giúp chẩn đoán nhiều bệnh lý khác nhau gây rối loạn sinh tổng hợp steroid bẩm sinh tuyến vỏ thượng thận từ hơn 35 năm qua [7],[8]. Các biến đổi nồng độ các steroid niệu trong các bệnh TSTTBS và rối loạn phát triển

giới tính có mẫu hình đặc trưng về sắc ký đồ và tỷ lệ chẩn đoán cho từng bệnh [11],[12].

Tại Việt Nam, từ 1999 đến 2016 có 842 bệnh nhân được chẩn đoán và điều trị TSTTBS tại Bệnh viện Nhi Trung ương [13]. Hiện tại, Bệnh viện Nhi trung ương đang sử dụng các xét nghiệm định lượng một số hormon bằng các kỹ thuật miễn dịch. Kỹ thuật miễn dịch đã giúp ích trong nhiều trường hợp, tuy nhiên nhiều trường hợp phức tạp bị bỏ sót. Hơn 200 trường hợp được phân tích gen CYP21A2, CYP11B1 giúp chẩn đoán xác định thiếu 21-OH hoặc thiếu 11 β -OH [14],[15]. Một số trường hợp thiếu 3 β -HSD II, 5 α -reductase type 2 được chẩn đoán nhờ gửi mẫu phân tích ở nước ngoài nên cần nhiều thời gian và kinh phí [16],[17]. Bệnh viện Nhi Trung ương là trung tâm chăm sóc sức khỏe trẻ em hàng đầu ở Việt Nam. Việc áp dụng kỹ thuật phân tích steroid niệu bằng GC-MS phù hợp với điều kiện Việt Nam, giúp nâng cao chất lượng chẩn đoán và theo dõi điều trị bệnh cho trẻ em là nhu cầu cần thiết. Thăm định phương pháp cần tiến hành trước khi đưa kỹ thuật xét nghiệm mới vào sử dụng nhằm đánh giá hiệu năng của phương pháp. Trên cơ sở kỹ thuật đã được chuẩn hóa, thăm định cần thiết lập khoảng tham chiếu giúp diễn giải kết quả xét nghiệm. Đây cũng là một đòi hỏi bắt buộc cho các phòng xét nghiệm được công nhận ISO 15189. Do vậy, đề tài **“Nghiên cứu định lượng steroid niệu bằng GC/MS trong chẩn đoán rối loạn sinh tổng hợp steroid bẩm sinh ở trẻ em”** tiến hành với hai mục tiêu:

Mục tiêu 1: Thăm định kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS và thiết lập khoảng tham chiếu steroid niệu ở trẻ em ≤ 11 tuổi.

Mục tiêu 2: Ứng dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS trong chẩn đoán một số bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid bẩm sinh.

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Kỹ thuật sắc ký khí - khối phổ

1.1.1. Nguyên lý chung của kỹ thuật sắc ký

Sắc ký là một phương pháp tách và phân tích các chất trong một hỗn hợp dựa vào sự phân bố khác nhau của các chất giữa pha động và pha tĩnh.

- Pha tĩnh (stationary phase) hay pha cố định, là phần chất liệu hay dung dịch được giữ cố định trong quá trình sắc ký. Pha tĩnh có tác dụng giữ các chất lại.
- Pha động (mobile phase): là phần khí hay dung dịch đi qua pha tĩnh, pha di động có tác dụng kéo các chất đi.

Hai pha này luôn tiếp xúc với nhau nhưng không trộn lẫn vào nhau. Các chất có ái lực càng cao với pha tĩnh sẽ di chuyển càng chậm trong quá trình sắc ký và ngược lại. Các phân tử có trọng lượng lớn, kích thước lớn sẽ di chuyển chậm hơn trong cột và xuất hiện sau các phân tử nhỏ, trọng lượng phân tử thấp.

1.1.2. Sắc ký khí – khối phổ

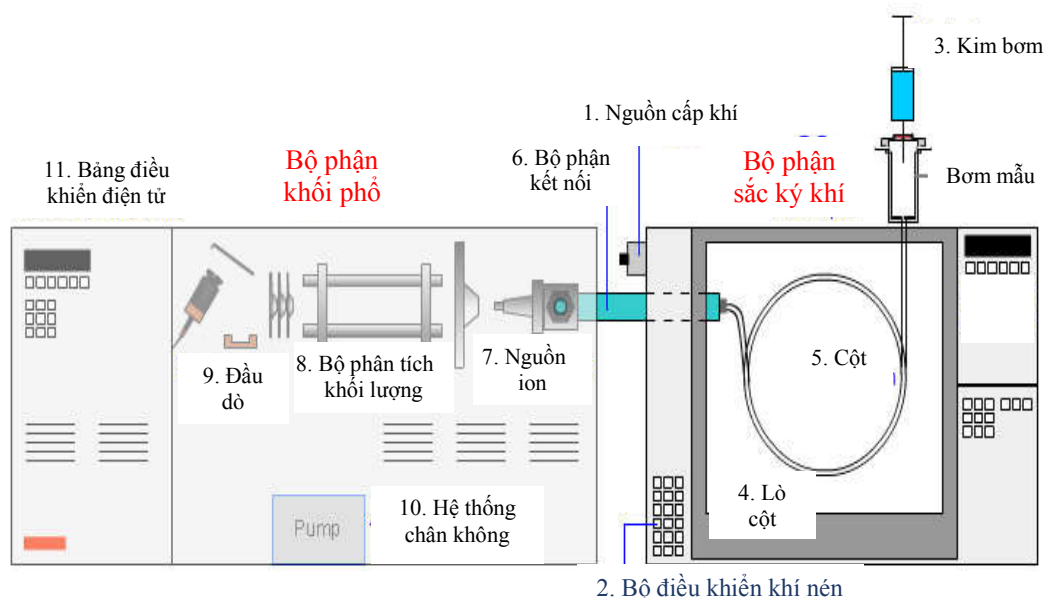
✓ Sắc ký khí khối phổ là phương pháp phân tích kết hợp giữa sắc ký khí (GC) và khối phổ (MS) để xác định các thành phần hoạt chất khác nhau trong mẫu thử. Các mẫu sắc ký khí ở dạng hơi hoặc dạng khí.

✓ Nguyên lý: Sắc ký khí giúp phân tách các thành phần khác nhau trong mẫu thành các chất nhờ ái lực của mỗi chất trong hỗn hợp mẫu có sự tương tác khác nhau với pha tĩnh. Các phân tử có trọng lượng nhỏ hơn sẽ xuất hiện trước, các phân tử có trọng lượng lớn hơn sẽ xuất hiện sau trên sắc ký đồ. Phần khối phổ có nhiệm vụ xác định định tính và định lượng các chất. Ở bộ phận khối phổ các phân tử mẹ được chọn lọc trước khi bị ion hóa và bị bắn phá thành các mảnh ion. Các ion chọn lọc đặc trưng cho mỗi chất được chuyển đến bộ phận lọc. Dựa trên khối lượng, bộ lọc lựa chọn chỉ cho phép các hạt có khối lượng nằm trong một giới hạn nhất định đi qua. Thiết bị cảm biến có nhiệm vụ đếm số lượng các hạt có cùng khối lượng. Thông tin này sau đó được chuyển đến

máy tính để tính toán các tín hiệu do bộ cảm biến cung cấp và đưa ra kết quả khối phổ.

GC/MS được coi là tiêu chuẩn vàng để xác định các hoạt chất bởi độ nhạy và độ đặc hiệu cao, mỗi chất được đặc trưng bởi thời gian lưu và các mảnh ion đặc hiệu cho cấu trúc phân tử của hoạt chất đó. GC/MS được ứng dụng trong phát hiện thuốc, các sản phẩm chuyển hóa trong nước tiểu, các chất có trong mẫu thử chưa biết. GC/MS là một phương pháp có độ nhạy cao được sử dụng để định tính và định lượng các chất ở thể khí (hay được hóa hơi). Ngưỡng phát hiện của phương pháp là picrogram [18].

1.1.2.1. Cấu tạo của hệ thống GC/MS



Hình 1.1. Cấu tạo hệ thống sắc ký khí – khối phổ [19]

- | | |
|-----------------------------|---------------------------------|
| 1. Nguồn cấp khí | 2. Bộ điều khiển khí nén |
| 3. Bơm tiêm mẫu | 4. Lò cột |
| 5. Cột | 6. Kết nối sắc ký với khối phổ |
| 7. Nguồn ion | 8. Bộ phận phân tích khối lượng |
| 9. Đầu dò | 10. Hệ thống chân không |
| 11. Bảng điều khiển điện tử | |

✓ Cửa tiêm mẫu: gồm một bơm tiêm mẫu tự động (3), dung môi chứa hỗn hợp các chất sẽ được tiêm tự động vào hệ thống tại cửa này. Mẫu sau đó được hệ thống cấp khí, điều khiển khí nén (1 và 2) dẫn qua hệ thống sắc ký khí, thường sử dụng các loại khí trơ như heli, hydro. Nhiệt độ ở cửa tiêm mẫu được nâng lên cao để mẫu từ dạng lỏng trở thành dạng khí.

✓ Vỏ ngoài: vỏ ngoài của hệ thống GC chính là một lò nung đặc biệt (4). Nhiệt độ của lò này dao động từ 40°C cho đến 320°C.

✓ Cột: bên trong hệ thống GC chính là một cuộn ống nhỏ hình trụ với mặt trong được tráng bằng một loại polymer đặc biệt (5). Các chất trong hỗn hợp được phân tách bằng cách chạy dọc theo cột này. Sau đó, khi phân tách hỗn hợp thành các thành phần khác nhau dựa theo ái lực khác nhau với pha tĩnh, các chất chuyển qua bộ phận kết nối sang bộ phận khối phổ.

✓ Nguồn ion: nguồn ion (7) cung cấp ion để ion hóa các sản phẩm trong hỗn hợp sau khi phân tách. Ion mẹ chuyển đến bộ phận phân tích khối lượng (8), bắn phá tạo thành các mảnh ion đặc trưng cho cấu trúc phân tử của chất phân tích. Các mảnh ion được chọn lọc, phát hiện bằng đầu dò khối phổ rất đặc hiệu (9).

✓ Hệ thống chân không: duy trì áp lực chân không trong bộ phận khối phổ (10).

✓ Bảng điều khiển điện tử: sử dụng để điều khiển hệ thống (11).

1.1.2.2. Kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS

Nguyên lý kỹ thuật theo Honour JW [18],[20]: thủy phân steroid liên hợp bằng enzym glucuronidase/sulphatase sau đó tách chiết các steroid tự do và tạo dẫn xuất steroid lần lượt với methoxyamin và trimethylsilylimidazole (TMSI). Tinh sạch steroid trước khi bơm mẫu vào hệ thống sắc ký khí- khối phổ. Trong máy, steroid được làm bay hơi ở nhiệt độ cao. Sau khi phân tách các steroid bởi bộ phận sắc ký khí, steroid được vận chuyển đến bộ phận khối phổ. Ion hóa các

steroid và bắn phá tạo các mảnh ion đặc trưng cho cấu trúc từng steroid và phát hiện bằng đầu dò khối phổ.

Quy trình kỹ thuật

Thủy phân steroid niệu liên hợp với acid glucuronic và acid sulphuric bằng enzym glucuronidase và arylsulphatase ở nhiệt độ 37°C qua đêm hoặc ở 55°C trong 3 giờ. Hoạt hóa cột Bond Elut bằng methanol và rửa lại bằng nước cất. Cho mẫu lên cột, các steroid tự do được tách chiết, tinh sạch bằng cột Bond Elut C18, chỉ steroid được giữ lại tại màng lọc của cột. Steroid tự do được rửa giải bằng methanol và làm khô bằng cách cho bay hơi để loại bỏ methanol khỏi steroid. Tạo dẫn xuất giữa steroid với methoxyamine và TMSI để bảo vệ các nhóm chức -OH không bị phân hủy bởi nhiệt độ cao trong khi làm hóa hơi steroid và thực hiện sắc ký khí. Steroid sau khi tạo dẫn xuất và tách chiết được bơm trực tiếp vào máy sắc ký khí khối phổ và được vận chuyển trong cột sắc ký nhờ khí trơ như heli. Sau khi phân tách các thành phần steroid khác nhau nhờ tương tác với pha rắn, các steroid được vận chuyển đến bộ phận khối phổ. Tại đây dưới tác dụng của dòng điện các steroid niệu được ion hóa, được bắn phá tạo thành các mảnh ion đặc trưng cho cấu trúc phân tử của các steroid. Trong phương pháp SIM (selected ion monitoring), chỉ ion chọn lọc mới đến bộ cảm biến để phát hiện. Mỗi steroid niệu đặc trưng bằng một đỉnh (peak) trên sắc ký đồ, thời gian xuất hiện đỉnh từ khi mẫu đi qua cột được gọi là thời gian lưu. Mảnh ion được bắn phá từ phân tử mẹ đặc trưng giúp nhận diện steroid trên sắc ký đồ [18].

Chuẩn nội (internal standard) được cho vào các mẫu với một lượng như nhau để hiệu chỉnh sự mất mát trong quá trình phân tích. Mẫu chuẩn được phân tích cùng với mẫu bệnh để xây dựng đường chuẩn giúp tính nồng độ steroid trong mẫu thử. Xác định thời gian lưu, ion đặc hiệu tương ứng của các steroid trong mẫu thử dựa vào phân tích các steroid tinh khiết trong mỗi mẻ phân tích.

Ưu điểm kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS: sắc ký giúp phân tách các steroid riêng biệt, các đồng phân được phân biệt trên sắc ký đồ nhờ thời gian lưu khác nhau. Các phân tử có cùng trọng lượng được phân biệt nhờ ion đặc hiệu cho mỗi steroid. Kỹ thuật có độ nhạy cao, có khả năng định lượng mẫu có nồng độ thấp do khả năng cô đặc, tinh sạch. Độ đặc hiệu cao nhờ phân tích cấu trúc phân tử của các steroid [11].

Nhược điểm kỹ thuật: thời gian xét nghiệm lâu hơn so với LC/MS-MS do thời gian thủy phân và tạo dẫn xuất kéo dài. Toàn bộ quá trình chuẩn bị mẫu thực hiện thủ công, cần người thực hiện có kinh nghiệm. Số lượng mẫu được thực hiện nhỏ do không thể tự động hóa quá trình chuẩn bị mẫu. Kỹ thuật khó phổ biến rộng rãi và kết quả có thể không tốt ở mẫu của trẻ sơ sinh do nồng độ các steroid rất thấp trong nước tiểu.

Hạn chế sai số: Tối ưu hóa điều kiện phản ứng của enzym glucuronidase bằng pH thích hợp của dung dịch đệm. Ổn định steroid tự do sau khi thủy phân bằng vitamin C. Trước khi tạo dẫn xuất cần làm khô hoàn toàn methanol để tránh sự ức chế khi tạo dẫn xuất, thời gian và nhiệt độ tạo dẫn xuất cần ổn định, lựa chọn ion đặc hiệu cho mỗi steroid niệu [21]. Với các mẫu nước tiểu loãng của trẻ sơ sinh có thể cô đặc bằng cách tách chiết qua cột một thể tích nước tiểu lớn hơn trước khi thủy phân [22].

Mỗi steroid niệu có thể là sản phẩm chuyển hóa của một hoặc nhiều hormon steroid khác nhau. Ngược lại, một hormon có thể chuyển hóa tạo ra nhiều sản phẩm steroid niệu. Danh mục chữ viết tắt, tên đầy đủ và nguồn gốc một số steroid niệu được mô tả chi tiết trong bảng 1.1 [11].

Bảng 1.1 Một số sản phẩm chuyển hóa steroid niệu

Tên viết tắt	Tên đầy đủ	Sản phẩm chuyển hóa của
An	Androsterone	Androstenedione, testosterone, 5 α -dihydrotestosterone, DHEA
Et	Etiocholanolone	Testosterone, DHEA
DHEA	Dehydroepiandrosterone	Dehydroepiandrosterone
11 β -OH-An	11 β -Hydroxy-androsterone	11 β -OH-androstenedione, cortisol
11 β -OH-Et	11 β -Hydroxy-etiocholanolone	Cortisol
11-OXO-Et	11-Oxo-etiocholanolone	Cortisol
16 α -DHEA	16 α -OH-DHEA	Dehydroepiandrosterone, Dehydroepiandrosterone-sulfate
PD	Pregnanediol	Progesterone, 11-deoxycorticosterone
5PD	Pregnenediol	Pregnenolone
Pregnadienol	Pregnadienol	Pregnenolone (pregnenediol)
17OHPN	17-OH-pregnanolone	17-OH-progesterone
3 α 5 α 17HP	3 α 5 α -17-OH-pregnanolone	17-OH-progesterone
PT	Pregnanetriol	17-OH-progesterone
5PT	5-Pregnenetriol	17-OH-pregnenolone
PTL	Pregnanetriolone	21-Deoxycortisol
THDOC	Tetrahydrodeoxycorticosterone	11-Deoxycorticosterone
THS	Tetrahydro-11-deoxycortisol	11-Deoxycortisol
THA	Tetrahydro-11-dehydrocorticosterone	Corticosterone
5 α THA	5 α -Tetra-11-dehydrocorticosterone	Corticosterone
THB	Tetrahydrocorticosterone	Corticosterone

Tên viết tắt	Tên đầy đủ	Sản phẩm chuyển hóa của
5 α THB	5 α -Tetrahydrocorticosterone	Corticosterone
THALDO	Tetrahydroaldosterone	Aldosterone
THE	Tetrahydrocortisone	Cortisol, cortisone
THF	Tetrahydrocortisol	Cortisol
5 α THF	5 α -Tetrahydrocortisol	Cortisol
α -Cortolone	α -Cortolone	Cortisol, cortisone
β -Cortolone	β -Cortolone	Cortisol, cortisone
α -Cortol	α -Cortol	Cortisol
β -Cortol	β -Cortol	Cortisol
6 β -OH-cortisol	6 β -OH-cortisol	Cortisol

1.2. Thẩm định phương pháp và thiết lập khoảng tham chiếu

1.2.1. Thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp là việc cung cấp những bằng chứng khách quan cho thấy một phương pháp dự kiến sử dụng hoặc đang sử dụng có thể đáp ứng được các yêu cầu đặt ra. Thẩm định phương pháp (method validation) cần thực hiện với các phương pháp chưa được nhà sản xuất thẩm định, các phương pháp có sự thay đổi so với ban đầu. Trong khi đó xác nhận phương pháp (method verification) là xác nhận lại các giá trị của nhà sản xuất công bố về kết quả thẩm định phương pháp. Hiện nay, nhiều thuật ngữ khác nhau được sử dụng như đánh giá phương pháp, định trị phương pháp, xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp, phê duyệt phương pháp. Các thuật ngữ này đều là cách gọi khác nhau của thẩm định phương pháp/ xác nhận phương pháp.

Thẩm định phương pháp nhằm đánh giá sai số kỹ thuật của phương pháp phân tích - một bước quan trọng trước khi đưa phương pháp mới vào sử dụng hoặc sau khi hiệu chỉnh phương pháp. Các phương pháp đo lường luôn bị ảnh

hưởng bởi sai số ngẫu nhiên và sai số hệ thống. Sai số hệ thống luôn xảy ra theo một hướng và làm cho tất cả các kết quả xét nghiệm cao hơn hoặc thấp hơn giá trị thực. Để khẳng định các tiêu chuẩn kỹ thuật của phương pháp đáp ứng với tiêu chuẩn chất lượng, các sai số gặp phải là chấp nhận được, cần thẩm định phương pháp với các thực nghiệm thích hợp.

Đối với các phương pháp phân tích hóa sinh, các thông số cần thẩm định bao gồm: độ đặc hiệu phân tích (Analytical Specificity), độ nhạy phân tích (Analytical sensitivity), khoảng tuyến tính và đường chuẩn (Linearity range and Calibration curve), độ lệch/độ đúng (Bias/trueness) hay độ chính xác/ xác thực (Accuracy), độ lặp hay độ tập trung (Precision). Sau khi các thông số thẩm định được đảm bảo cần thiết lập khoảng tham chiếu (Reference intervals). Việc lựa chọn các thông số thẩm định tùy thuộc vào kỹ thuật áp dụng trong phòng xét nghiệm, yêu cầu của phương pháp, điều kiện và nguồn lực của phòng xét nghiệm...

Độ nhạy phân tích (Analytical Sensitivity)

Hướng dẫn của CLSI khuyến cáo sử dụng 3 thông số sau:

Giới hạn trắng (limit of blank: LOB) là kết quả đo lường cao nhất có thể quan sát được của mẫu trắng; thường ước tính bằng giá trị trung bình + 1,65SD của mẫu trắng.

Giới hạn phát hiện (limit of detection - LOD) là nồng độ thấp nhất của chất phân tích có thể phát hiện được bằng phương pháp định lượng ở điều kiện xác định.

Giới hạn định lượng (limit of quantification: LOQ) là nồng độ thấp nhất của chất phân tích có thể định lượng được mà kết quả có độ lặp và độ tái lặp chấp nhận được, $CV < 20\%$ [23].

Độ lặp và tái lặp (Precision)

Độ lặp (còn gọi là độ chụm, độ tập trung) là mức độ gần đúng giữa các kết quả thực hiện độc lập trên cùng một mẫu và trong cùng một điều kiện thực hiện. Thực nghiệm đánh giá độ lặp ước tính sai số ngẫu nhiên gây ra bởi các yếu tố khác nhau trong quá trình tiến hành của phương pháp. Đây được xem như thực nghiệm đầu tiên trong đánh giá một phương pháp mới.

Có hai loại độ lặp cần đánh giá: độ lặp ngắn hạn (short-term precision) còn gọi là độ lặp trong một lần chạy (within-run precision); độ tái lặp (long-term precision) là độ lặp giữa các lần chạy (between-day precision, day-to-day precision). Để xác định độ lặp có thể sử dụng mẫu chuẩn, mẫu nội kiểm hoặc mẫu bệnh phẩm, mẫu trộn có chất nền giống như mẫu bệnh để đánh giá. Số lần chạy lặp lại tối thiểu là 20 lần trong một ngày với độ lặp lại và trong > 20 ngày với độ tái lặp. Tính SD và CV từ các kết quả chạy lặp lại thu được, so sánh kết quả CV với tiêu chuẩn cho phép.

Độ xác thực hay độ chính xác (Accuracy)

Độ xác thực là mức độ gần đúng giữa kết quả một phép đo và giá trị thật của phép đo, trị số thực là khái niệm lý tưởng rất khó thực hiện được trên thực tế mà chỉ có giá trị thực theo quy ước.

Thực nghiệm so sánh phương pháp được tiến hành để đánh giá độ xác thực (accuracy) hay sai số hệ thống của phương pháp. Tiến hành phân tích các mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân bằng phương pháp mới (phương pháp cần thẩm định) và phương pháp tham chiếu (reference method), sau đó đánh giá sai số hệ thống dựa trên sự khác biệt giữa hai phương pháp. Nhiều thuật toán thống kê có thể sử dụng để phân tích kết quả của thử nghiệm so sánh phương pháp: đồ thị khác biệt (difference plot), đồ thị so sánh (comparison plot), phân tích hồi quy tuyến tính, tính hệ số tương quan. Phương trình tương quan thiết lập được từ phân tích hồi quy tuyến tính là $y = ax + b$. Trong đó y là kết quả của phương pháp

xét nghiệm cần thẩm định, x là kết quả phương pháp tham chiếu, a là độ dốc, b là giao điểm của đồ thị với trục tung. Độ dốc cho biết sai số tỷ lệ (proportional error) giữa phương pháp cần xác nhận với phương pháp tham chiếu, lý tưởng a có giá trị bằng 1 (thường là 95% CI của độ dốc a bao hàm giá trị 1). Giao điểm cho biết sai số hằng định (constant error) giữa phương pháp cần xác nhận với phương pháp tham chiếu, lý tưởng b có giá trị bằng 0 (thường là 95% CI của giá trị b bao hàm giá trị 0).

Sự khác biệt giữa phương pháp cần thẩm định với phương pháp tham chiếu cần được phân tích, đánh giá. Nếu sự khác biệt nhỏ, có thể xem như hai phương pháp có độ xác thực tương đương nhau, hai phương pháp tương đồng và phương pháp mới có thể thay thế cho phương pháp tham chiếu. Nếu sự khác biệt lớn và không thể chấp nhận được về y khoa, cần phải đánh giá xem phương pháp nào xác thực hơn. Thực nghiệm đánh giá độ thu hồi (recovery experiment) và thực nghiệm đánh giá yếu tố nhiễu (interference experiment) có thể sử dụng để cung cấp thêm các thông tin [23].

Trên thực tế, phòng xét nghiệm khó có thể có phương pháp tham chiếu để so sánh với phương pháp cần thẩm định. Trong trường hợp này, thực nghiệm đánh giá độ xác thực có thể được tiến hành bằng việc tham gia vào chương trình ngoại kiểm. So sánh kết quả thu được của phương pháp làm tại phòng xét nghiệm và kết quả ngoại kiểm gửi về. Chương trình ngoại kiểm steroid niệu rất hữu ích và cần thiết trong so sánh, đánh giá kết quả giữa các phòng xét nghiệm khác nhau cùng tham gia trên thế giới [24].

Thực nghiệm xác định độ thu hồi (recovery experiment)

Sử dụng hai mẫu trong đó mẫu 1 thêm chất chuẩn, mẫu 2 thêm cùng thể tích dung dịch pha loãng chất chuẩn. Thể tích thêm vào phải không quá 10% để không ảnh hưởng đến chất nền phân tích và không vượt ra ngoài giới hạn tuyến tính của các chất phân tích. Phân tích hai mẫu trên, mỗi mẫu được đo lặp lại ≥ 3 lần và tính độ thu hồi.

Công thức tính nồng độ thu hồi và % thu hồi như sau:

Nồng độ chuẩn thêm vào = Nồng độ chuẩn x thể tích chuẩn thêm vào (mL)

Nồng độ thu hồi = Nồng độ mẫu thêm chuẩn – Nồng độ mẫu thêm nước cất

Thu hồi (%) = Nồng độ thu hồi / Nồng độ chuẩn thêm vào x 100

Honour JW thấy rằng kết quả thẩm định phương pháp định lượng steroid niệu thường có độ thu hồi đạt khoảng 90%, độ lặp và độ tái lặp khoảng < 25%, độ nhạy tùy thuộc từng xét nghiệm định lượng steroid, để phát hiện được đỉnh trên sắc ký đồ cần khoảng 10ng steroid tiêm vào cột sắc ký hoặc 200pg steroid được tiêm vào cột với sắc ký khí – khối phổ chọn lọc ion (GC/MS-SIM) [18].

1.2.2. Thiết lập khoảng tham chiếu

Khoảng tham chiếu là khoảng phân bố đặc trưng của giá trị ở một quần thể tham chiếu sinh học. Khoảng tham chiếu là đặc tính cuối cùng được đánh giá trong quá trình thẩm định phương pháp vì khoảng tham chiếu không phải là yếu tố quyết định hiệu năng của phương pháp có chấp nhận được hay không. Nếu phương pháp chấp nhận được thì điều quan trọng tiếp theo là thiết lập khoảng tham chiếu mới cho xét nghiệm hoặc xác nhận khoảng tham chiếu của nhà sản xuất để hỗ trợ cho việc diễn giải kết quả xét nghiệm của người bệnh.

Hướng dẫn CLSI EP28A-C3 đưa ra quy trình chi tiết giúp phòng xét nghiệm có thể thiết lập hoặc xác nhận khoảng tham chiếu [25]. Với mỗi kỹ thuật xét nghiệm mới được triển khai tại phòng xét nghiệm, rất cần thiết lập khoảng tham chiếu (reference interval) vì các thông số đó có sự khác biệt giữa các đối tượng: sự khác biệt theo giới tính, theo tuổi, theo chủng tộc và vùng địa lý. Vì vậy các chuyên gia y tế khuyến cáo, mỗi phòng xét nghiệm nên tự thiết lập giá trị tham chiếu cho riêng mình với mỗi xét nghiệm theo các bước:

Bước 1: lựa chọn quần thể tham chiếu là quần thể những người khỏe mạnh ít có nguy cơ mắc các bệnh được nghiên cứu mà từ đó lựa chọn ra đối tượng tham chiếu để thiết lập khoảng tham chiếu. Quần thể tham chiếu cần đại diện

cho quần thể lớn. Căn cứ vào các thông tin và các nghiên cứu có trước để lựa chọn quần thể nghiên cứu thích hợp.

Bước 2: lựa chọn đối tượng tham chiếu trong quần thể nghiên cứu mà cách đơn giản nhất là dựa vào bộ câu hỏi phỏng vấn. Các câu hỏi phỏng vấn nhằm xác định thông tin cá nhân, các thói quen và yếu tố có thể ảnh hưởng đến xét nghiệm cần xây dựng khoảng tham chiếu để loại bỏ những cá nhân có nguy cơ cao mắc bệnh được nghiên cứu. Một số yếu tố cần được phỏng vấn là hút thuốc, uống rượu, mang thai, tiền sử gia đình, các thuốc hiện đang dùng... Thông thường có hai cách lấy mẫu để thiết lập khoảng tham chiếu là lấy mẫu trực tiếp và lấy mẫu gián tiếp. Mẫu trực tiếp được lấy từ đối tượng tham chiếu đã được lựa chọn qua sàng lọc bằng bộ câu hỏi phỏng vấn với người khỏe mạnh trong cộng đồng. Cách lấy mẫu gián tiếp từ những mẫu đã thu thập để cho mục đích khác trong phòng xét nghiệm như mẫu của người cho máu khỏe mạnh, của người đến khám sức khỏe định kỳ, của người thực hiện xét nghiệm sàng lọc của người bệnh đến thực hiện tiểu phẫu hoặc người đến làm sàng lọc gen.

Bước 3: chuẩn bị phân tích mẫu và phân tích mẫu với các trang thiết bị để phân tích mẫu cần chuẩn bị tốt nhất, ổn định và đã qua đánh giá đạt kết quả thẩm định tốt. Tối ưu hóa các điều kiện phân tích (nước, hóa chất, nhân lực) để kết quả phân tích mẫu nhằm xây dựng khoảng tham chiếu chính xác nhất.

Bước 4: thu thập mẫu, vận chuyển và bảo quản mẫu. Tùy thuộc loại mẫu và thu thập mẫu đúng thời gian thích hợp nhất, vận chuyển và bảo quản mẫu phù hợp theo hướng dẫn lấy mẫu và bảo quản mẫu của nhà sản xuất. Số lượng mẫu cần để thiết lập khoảng tham chiếu phải đảm bảo có thể phân biệt phân vị thứ 2,5 và thứ 5 cũng như phân vị thứ 95 và 97,5 là ≥ 39 mẫu. Thông thường với các xét nghiệm thường quy ở người trưởng thành khỏe mạnh, cỡ mẫu tối thiểu được khuyến cáo là 120 mẫu cho mỗi nhóm. Các xét nghiệm phức tạp, đắt tiền, đối tượng trẻ sơ sinh khó lấy mẫu số lượng mẫu có thể thấp hơn.

Bước 5: phân tích mẫu theo quy trình chuẩn đã xây dựng, chú ý các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm. Các xét nghiệm mới, máy phân tích mới cần thẩm định phương pháp đạt yêu cầu chất lượng trước khi thực hiện phân tích mẫu để xây dựng khoảng tham chiếu. Thẩm định phương pháp bằng các thông số độ lặp, độ tái lặp, đô thu hồi, giới hạn phát hiện, khoảng tuyến tính cần thực hiện theo hướng dẫn của CLSI nhằm đảm bảo kết quả phân tích.

Bước 6: loại bỏ số liệu phân tán và tính giá trị khoảng tham chiếu. Các số liệu sau khi phân tích cần xác định sự phân bố của chúng theo quy luật chuẩn (Gauss) hay không. Các số liệu phân tán ở hai đầu thấp và cao sau khi sắp xếp theo thứ tự tăng dần cần xem xét loại bỏ. Tính giá trị khoảng tham chiếu tùy thuộc sự phân bố của số liệu, nếu phân bố không theo quy luật chuẩn thì khoảng tham chiếu được lấy là 95% giá trị nằm giữa từ phân vị 2,5 đến phân vị 97,5. Nếu phân bố số liệu theo quy luật chuẩn khoảng tham chiếu được tính là giá trị trung bình $\pm 2SD$.

Thiết lập khoảng tham chiếu cần nhiều thời gian, công sức, tiền bạc nên không dễ thực hiện ở tất cả các phòng xét nghiệm cho tất cả các xét nghiệm. Tuy nhiên, thiết lập khoảng tham chiếu là bắt buộc với các kỹ thuật lần đầu được triển khai và chưa có khoảng tham chiếu của nhà sản xuất hay khoảng tham chiếu của phòng xét nghiệm khác lân cận. Vì vậy, có thể sử dụng cách thứ hai là xác nhận khoảng tham chiếu của phòng xét nghiệm khác hoặc nhà sản xuất cho các phòng xét nghiệm nhỏ, ít có điều kiện thiết lập mới khoảng tham chiếu.

Khoảng tham chiếu nồng độ và tỷ lệ các steroid niệu được nhiều tác giả công bố trên các tạp chí thế giới. Caulfield M và cộng sự thiết lập khoảng tham chiếu cho 59 trẻ sơ sinh theo đơn vị $\mu\text{g/g}$ creatinine và sử dụng mẫu nước tiểu ngẫu nhiên trong đó có một số steroid đặc trưng cho trẻ sơ sinh như $6\alpha\text{-OH-THA}$, $16\alpha\text{-OH-DHEA}$, $6\alpha\text{-OH-THS}$... [7]. Homma K và cộng sự xây dựng khoảng tham chiếu cho 62 trẻ sơ sinh sử dụng đơn vị mg/g creatinine, trong đó có nồng độ PTL và tỷ lệ $\text{PTL}/(\beta\text{-THE} + \alpha\text{-THE})$ để chẩn đoán thiếu 21-OH cho

trẻ sơ sinh [12]. Nasser A. Dhayat và cộng sự nghiên cứu thiết lập khoảng tham chiếu steroid niệu theo đơn vị $\mu\text{g}/\text{mmol}$ creatinine cho 43 trẻ từ mới sinh đến 1 tuổi ở nhiều tuần khác nhau nhằm thiết lập đường cong sự biến đổi các steroid niệu theo thời gian phát triển của trẻ [26]. Lucas-Herald AK thiết lập khoảng tham chiếu cho các tỷ lệ chẩn đoán ở 252 đối tượng từ sơ sinh đến trưởng thành [27]. Bên cạnh đó, nhiều bài báo khi công bố ứng dụng định lượng steroid niệu bằng GC/MS trong chẩn đoán cá bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid đã công bố giá trị tham chiếu làm căn cứ chẩn đoán.

1.3. Sinh tổng hợp hormon steroid và bệnh rối loạn tổng hợp steroid bẩm sinh

1.3.1. Tổng hợp hormon steroid

Cholesterol được vận chuyển vào trong ty thể nhờ protein StAR (*steroid acute response protein*). Trong ty thể, cholesterol cắt đi một chuỗi 5C nhờ enzym desmolase tạo ra pregnenolone là chất trung gian, pregnenolone ra khỏi ty thể đến lưới nội bào để tổng hợp nên cả ba nhóm hormon steroid.

Nhóm 1 gồm các hormon tham gia chuyển hóa muối nước như DOC, corticosterone, 18OH-corticosterone, aldosterone (nền màu xanh lá cây).

Nhóm 2 gồm các hormon tham gia chuyển hóa glucose như 11-deoxycortisol, cortisol, cortisone (nền màu cam).

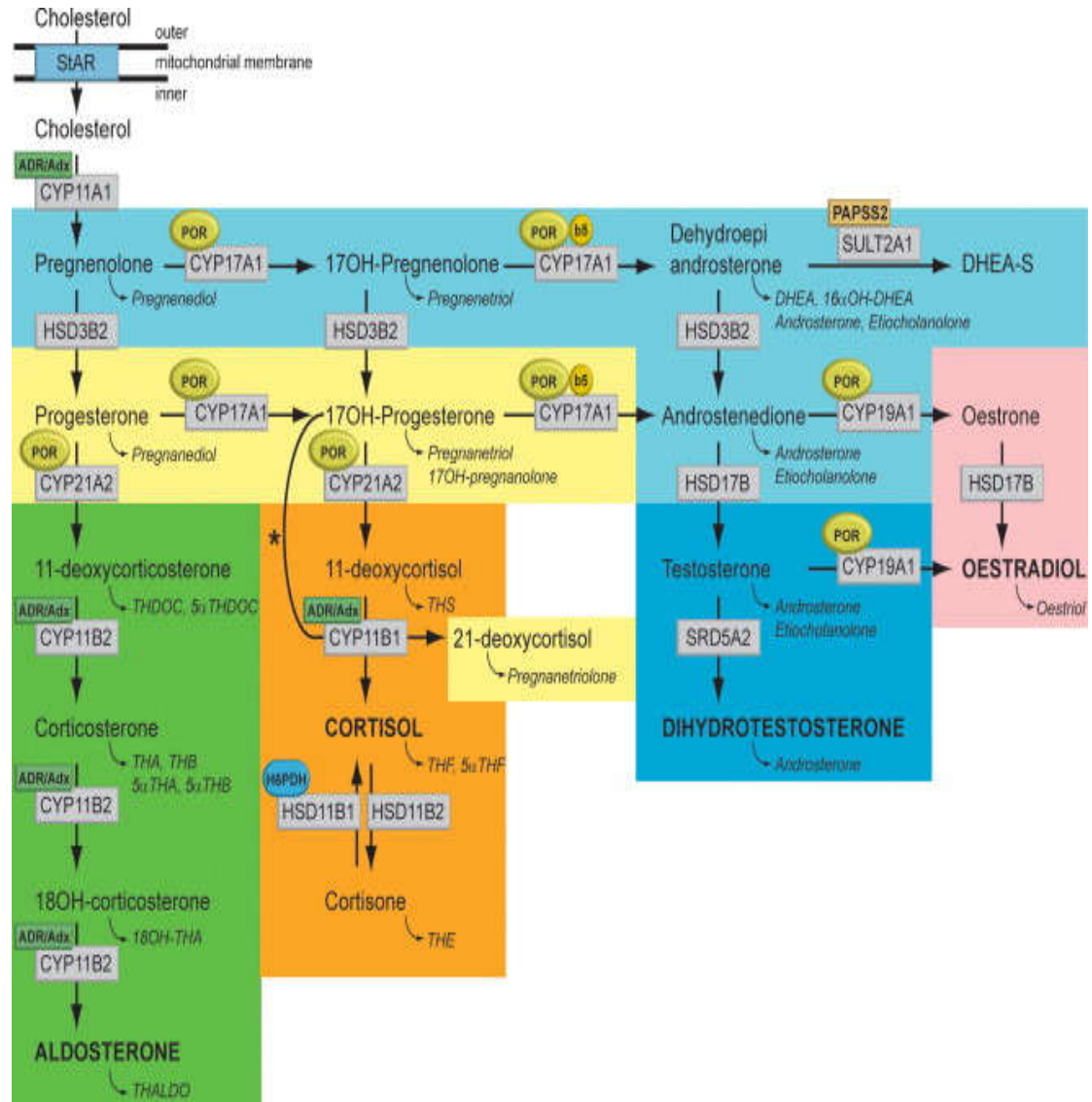
Nhóm 3 gồm các hormon sinh dục nam như testosterone, 5 α -DHT (nền màu xanh đậm). Hormon sinh dục nữ như oestrone, oestradiol (nền màu hồng).

Một số tiền chất để tổng hợp cho cả ba nhóm hormon đặc biệt hormon sinh dục có nền màu xanh nhạt và tiền chất tổng hợp cortisol như progesterone, 17-OHP (nền màu vàng).

Các gen CYP21A2, CYP11B1, HSD3B2, CYP11B2, CYP17A1... là gen quy định tổng hợp các enzym 21-OH, 11 β -OH, 3 β -HSD, 17 α -OH...

Các sản phẩm chuyển hóa của steroid trong nước tiểu như THE

(tetrahydrocortisone), THF (tetrahydrocortisol), 5 α -THF, THS (tetrahydro-11-deoxicortisol), THA (tetrahydroaldosterone), THB (tetrahydrocorticosterone), An (androsterone), Et (etiocholanolone), PD (pregnanediol), PTL (pregnanetriolone), PT (*pregnanetriol*), 17OHPN (17-hydroxypregnanolone)...



Hình 1.2. Sơ đồ sinh tổng hợp các hormon steroid [11]

1.3.2. Bệnh lý rối loạn tổng hợp hormon steroid bẩm sinh

Các rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid bẩm sinh bao gồm [1],[2]:

Nhóm 1: bất thường tổng hợp glucocorticoid gây tăng sản thượng thận bẩm sinh do tuyến thượng thận giảm hoặc mất khả năng tổng hợp cortisol.

Nhóm 2: bất thường tổng hợp hormon chuyển hóa muối-nước và glucocorticoid gây mất cân bằng nước – điện giải.

Nhóm 3: bất thường tổng hợp hormon sinh dục: giảm tổng hợp androgen hoặc estrogen gây rối loạn phát triển giới tính.

Ngoài ra, có thể gặp các bất thường tại thụ thể của hormon steroid gây ra các triệu chứng giống với rối loạn tổng hợp hormon steroid.

1.3.2.1. Rối loạn sinh tổng hợp hormon nhóm glucocorticoid gây tăng sản thượng thận bẩm sinh

Ca lâm sàng đầu tiên mắc TSTTBS được mô tả trong y văn vào năm 1865 bởi một nhà giải phẫu người Italia [2]. TSTTBS là bệnh di truyền gen lặn trên nhiễm sắc thể thường do đột biến gen gây thiếu hụt một trong năm enzym tham gia tổng hợp cortisol hoặc bất thường protein vận chuyển cholesterol vào trong ty thể. Khi nồng độ cortisol thấp kích thích tuyến yên tăng bài tiết ACTH, làm tăng sinh tế bào tuyến thượng thận gây tăng sản thượng thận, tăng tiết androgen nguồn gốc thượng thận gây rối loạn phát triển giới tính ở nữ. Các thể bệnh TSTTBS là:

- TSTTBS do thiếu enzym 21-OH.
- TSTTBS do thiếu enzym 11 β -OH.
- TSTTBS do thiếu enzym 3 β -HSD type II.
- TSTTBS do thiếu enzym 17 α -hydroxylase/17,20 lyase.
- TSTTBS thể lipid hóa (*Lipoid adrenal hyperplasia*) do bất thường protein StAR hoặc enzym tách cholesterol khỏi protein vận chuyển P450scc.

- Thiếu hụt Cyt P450-oxidoreductase (POR) gây giảm hoạt tính đồng thời một số enzym như 21-OH, 17 α -hydroxylase, aromatase.

Thiếu enzym 21- hydroxylase

Enzym 21-OH xúc tác phản ứng chuyển 17-OHP thành 11-deoxycortisol tiền chất để tổng hợp cortisol và xúc tác chuyển progesterone thành 11-deoxycorticosterone tiền chất để tổng hợp aldosterone. Thiếu hụt enzym 21-OH thường gặp nhất trong số các rối loạn tổng hợp hormon steroid, gồm thể cổ điển mất muối, thể nam hóa đơn thuần và thể không cổ điển [28]:

Thể mất muối có triệu chứng thừa androgen từ trong bào thai, rối loạn nước và điện giải, chiếm khoảng 75% người bệnh mắc TSTTBS thể cổ điển.

Thể nam hóa đơn thuần không rối loạn nước điện giải, chỉ thừa androgen từ trong bào thai, chiếm khoảng 25% người bệnh mắc TSTTBS thể cổ điển.

Thể khởi phát muộn hay không cổ điển với dấu hiệu thừa androgen xuất hiện muộn sau khi sinh, không có rối loạn nước–điện giải.

Đến nay, hơn 30 triệu trẻ sơ sinh đã được sàng lọc ở trên 30 quốc gia và vùng lãnh thổ. Tần xuất mắc thiếu enzym 21-OH thể cổ điển khác nhau tùy theo từng chủng tộc, vùng địa lý, trung bình ở Hoa Kỳ và châu Âu là khoảng 1:15.000 đến 1:16.000 trẻ sơ sinh sống [29]. Tần xuất TSTTBS thiếu 21-OH thể cổ điển ở New York là 1:18.170 [30], ở vùng Emilia thuộc Italia là 1:8.586 [31]. Tần xuất mắc TSTTBS cao nhất ở người Yupik Eskimos ở phía tây nam bang Alaska (1:282) và người dân sống trên đảo Réunion thuộc Pháp ở Ấn Độ Dương (1:2.141) [5]. Tần xuất thiếu enzym 21-OH thể không cổ điển cao hơn thể cổ điển và có thể lên đến 3% tùy từng chủng tộc, trung bình khoảng 1:100 ở quần thể người da trắng, cao nhất là 1:27 ở người Ashkenazi Jews, 1:53 ở chủng tộc Tây Ban Nha, thấp hơn ở một số nước châu Âu [28]. Mặc dù giá thành để phát hiện được một trường hợp mắc TSTTBS là khá lớn, tuy nhiên

việc sàng lọc, phát hiện sớm giúp điều trị kịp thời cho người bệnh được thực hiện thường quy ở nhiều nước trên thế giới từ những năm 1980 đến nay [31],[32],[33].

Đặc điểm lâm sàng:

Triệu chứng nổi bật ở người thiếu enzym 21-OH cổ điển là do tăng nồng độ androgen trong máu biểu hiện các dấu hiệu nam hóa ở trẻ nữ xuất hiện từ khi mang thai và biểu hiện ngay sau sinh. Cơ quan sinh dục nữ biến đổi theo hướng giống bộ phận sinh dục nam: phì đại âm vật giống dương vật, mức độ phân loại theo Prader từ độ I đến V. Cơ quan sinh dục bên trong như tử cung, vòi trứng, buồng trứng ở bé gái bình thường. Ở trẻ nam, không có dấu hiệu bất thường ở bộ phận sinh dục [3],[28].

Rối loạn nước – điện giải: aldosterone giảm ở khoảng 75% trường hợp mắc TSTTBS thể 21-OH cổ điển gây hạ natri, kali tăng cao và dấu hiệu mất nước mạn tính xuất hiện như giảm cân, da khô, nhăn, thóp lõm, li bì, chậm chạp thậm chí hôn mê.

Khoảng 25% người bệnh thiếu hụt 21-OH cổ điển chỉ biểu hiện rối loạn giới tính đơn thuần mà không có rối loạn điện giải. Các dấu hiệu nam hóa xuất hiện sớm ngay sau khi sinh ở trẻ nữ [2],[3].

Thể không cổ điển hay thể khởi phát muộn: các dấu hiệu thừa androgen xuất hiện sau khi sinh. Lần đầu tiên, một trường hợp TSTTBS thể khởi phát muộn được phát hiện năm 1957 ở một nữ chậm có con với dấu hiệu rậm lông và có nhiều mụn trứng cá [34]. Ở nam, các dấu hiệu chậm có con do testosterone được sản xuất tại tuyến thượng thận thay vì tại tinh hoàn gây giảm sinh tinh trùng, tinh hoàn kém phát triển [28],[34].

Đặc điểm cận lâm sàng:

Xét nghiệm máu có thể thấy tình trạng rối loạn nước- điện giải ở người bệnh TSTTBS thể mất muối với nồng độ natri thấp, nồng độ kali cao, hoạt

tính aldosterone thấp trong khi hoạt tính hệ renin tăng cao. Nồng độ cortisol có thể thấp hoặc bình thường tùy thời điểm lấy mẫu nhưng nồng độ ACTH trong máu thường tăng ở mọi lứa tuổi. Nồng độ 17-OHP, DHEA, androstenedione, testosterone tăng rất cao trong máu khi thiếu niên và trưởng thành ở thể thiếu hụt 21-OH cổ điển. Với thể không cổ điển, xét nghiệm thấy tăng nồng độ 17-OHP trước và sau 30-60 phút khi làm nghiệm pháp kích thích bằng ACTH [3].

Xét nghiệm di truyền: thiếu enzym 21-OH là bệnh rối loạn sinh tổng hợp steroid bẩm sinh, di truyền gen lặn do đột biến gen CYP21A1 trên nhiễm sắc thể số 6 (6p21.3). Một số đột biến nặng (null) gây mất gần như hoàn toàn hoạt tính enzym 21-OH (hoạt độ 21-OH còn lại dưới 1% trên in vitro) gây TSTTBS thể mất muối, rối loạn nước điện giải xuất hiện sớm trong tháng đầu của trẻ. Đột biến gây giảm hoạt tính enzym còn 1-10% gây nam hóa đơn thuần, các dấu hiệu xuất hiện khi sinh. Các đột biến gây giảm hoạt tính enzym còn khoảng 30-50% chỉ gây thể không cổ điển [34]. Hiện có hơn 140 đột biến trên CYP21A2 được phát hiện [3] trong đó chỉ khoảng hơn 10 -12 đột biến thường gặp [35].

Thiếu enzym 11 β -hydroxylase

Enzym 11 β -OH xúc tác chuyển 11-deoxycortisol (hợp chất S) thành cortisol và chuyển DOC thành corticosterone ở lớp bó và lớp lưới của vỏ thượng thận. Thiếu enzym 11 β -OH gây giảm tổng hợp cortisol, tăng 11-deoxycortisol và DOC. TSTTBS do thiếu hụt 11 β -OH chiếm 5-8% các trường hợp TSTTBS, đứng vị trí thứ hai sau thiếu hụt 21-OH. Tần xuất TSTTBS do thiếu hụt 11 β -OH thể cổ điển khoảng 1:100.000 đến 1:200.000 trẻ sơ sinh sống [9]. Ở châu Âu thiếu 11 β -OH thể cổ điển khoảng < 5% tổng số người bệnh TSTTBS. Tần xuất thiếu 11 β -OH thể cổ điển cao hơn ở người Moslem và Jewish tại Israel-Trung Đông, có thể lên đến 1:5.000 đến 1:7.000 trẻ sơ sinh sống chiếm đến 15% tổng số người bệnh TSTTBS [36].

Thiếu 11β -OH gồm thể cổ điển và thể không cổ điển. Thể cổ điển có triệu chứng thường gặp do tăng tiết androgen tương tự như thiếu hụt 21 -OH gây nam hóa trẻ nữ, cơ quan sinh dục ngoài không rõ ràng. Đồng thời ở người bệnh thiếu 11β -OH cổ điển thường kèm tăng natri, hạ kali, tăng huyết áp, đau đầu. Thể thiếu hụt 11β -OH không cổ điển với dấu hiệu thừa androgen xuất hiện sau khi sinh nhưng không kèm rối loạn nước – điện giải. Thể không cổ điển của thiếu 11β -OH rất ít được công bố do không có các dấu hiệu trên lâm sàng, chẩn đoán cần định lượng 11 -deoxycortisol trước và sau khi kích thích bằng ACTH hoặc phân tích gen CYP11B1 [37].

Xét nghiệm máu ở người bệnh thiếu 11β -OH thấy natri cao và kali thấp, nồng độ DOC, 11 -deoxycortisol, androgen cao [3]. Nồng độ ACTH cao, nồng độ cortisol trong máu có thể thấp hoặc bình thường, một số trường hợp nồng độ cortisol tăng cao giả tạo do phản ứng chéo giữa cortisol và 11 -deoxycortisol khi định lượng cortisol theo nguyên lý miễn dịch [38]. Một số khó khăn trong chẩn đoán thiếu 11β -OH đã được các tác giả ghi nhận đặc biệt ở trẻ sơ sinh [39] và những người bệnh đã điều trị thuốc khác nhau [40]. Thể thiếu hụt 11β -OH không cổ điển hiếm gặp với dấu hiệu nam hóa nhẹ do thừa androgen, cả thể cổ điển và không cổ điển được chẩn đoán xác định khi phân tích gen CYP11B1 [41].

Đột biến gen CYP11B1 mã hóa cho enzym 11β -OH (P450c11B1) nằm trên nhiễm sắc thể số 8 (8q24.3) gây giảm một phần hoặc hoàn toàn hoạt tính của enzym 11β -OH gây TSTTBS thể thiếu 11β -OH. Khoảng 60 đột biến khác nhau trên gen CYP11B1 được phát hiện trong đó có đột biến điểm gây bệnh và những đột biến tạo bộ ba vô nghĩa [9],[41],[42]. Một số nghiên cứu cho thấy có thể đột biến khảm giữa hai gen CYP11B1 và CYP11B2 ở bệnh nhân TSTTBS do thiếu 11β -OH [43].

Sàng lọc TSTTBS đôi khi phát hiện trường hợp thiếu 11β -OH thể cổ điển do có tăng nồng độ 17-OHP tuy nhiên số lượng không nhiều [44].

Thiếu enzym 3β -hydroxysteroid dehydrogenase type II

Enzym 3β -HSD có hai isozym là 3β -HSD type I và 3β -HSD type II trong đó 3β -HSD type II xúc tác chuyển liên kết đôi của steroid từ vị trí $\Delta 5$ sang $\Delta 4$ trong quá trình tổng hợp hormon steroid tại tuyến sinh dục và tuyến thượng thận. Thiếu hụt 3β -HSD type II gây giảm tổng hợp toàn bộ 3 nhóm hormon vô thượng thận là aldosterone, cortisol, androgen; làm tăng DHEA, DHEA-S và là nguyên nhân hiếm gặp gây TSTTBS, RLPTGT [3].

Lâm sàng chia thiếu hụt 3β -HSD type II làm hai thể: thể cổ điển và thể không cổ điển. Triệu chứng lâm sàng của người bệnh thiếu 3β -HSD type II thể cổ điển là không hoàn chỉnh các đặc tính giới tính ở trẻ trai, tinh hoàn không xuống bìu do giảm tổng hợp androgen. Trẻ nữ thường biểu hiện đặc điểm sinh dục ngoài bình thường hoặc xuất hiện một vài đặc điểm thay đổi nhẹ hệ sinh dục theo hướng nam hóa như phì đại âm vật do tăng DHEA [1],[3]. Cả nam và nữ có thể xuất hiện triệu chứng suy thượng thận, sạm da, mất nước, giảm nồng độ natri và tăng kali máu do giảm tổng hợp aldosterone. Thiếu 3β -HSD type II thể không cổ điển không gây rối loạn nước – điện giải, nam hóa không hoàn toàn ở trẻ nam, dấu hiệu nam hóa trẻ nữ xuất hiện muộn.

Xét nghiệm ở người bệnh thiếu 3β -HSD type II thấy nồng độ aldosterone, cortisol và hormon sinh dục như androstenedione và testosterone thấp trong khi nồng độ ACTH, 17-pregnenolone và DHEA cao trong máu [3]. Chẩn đoán xác định thiếu 3β -HSD type II dựa vào phân tích gen được công bố, thường gặp các đột biến điểm [45],[46].

Thiếu enzym 17α -hydroxylase/17,20-lyase

Gen CYP17A1 mã hóa cho protein có hai hoạt tính enzym là 17α -hydroxylase và 17,20-lyase. Enzym 17α -hydroxylase xúc tác phản ứng

chuyển pregnenolone thành 17OH-pregnenolone và chuyển progesterone thành 17OH-progesterone là tiền chất để tổng hợp cortisol. Enzym 17,20-lyase xúc tác phản ứng chuyển 17OH pregnenolone thành DHEA- tiền chất tổng hợp nên androstenedione, testosterone và 5 α -DHT. Thiếu enzym 17 α -hydroxylase/17,20-lyase là nguyên nhân hiếm gặp gây TSTTBS và RLPTGT, chiếm chưa đến 1% các trường hợp TSTTBS [3]. Giảm tổng hợp hormon steroid ở cả tuyến thượng thận và tuyến sinh dục, đồng thời giảm tổng hợp cortisol dẫn đến tăng tiết ACTH, tăng nồng độ DOC, corticosterone trong máu làm tăng huyết áp [47].

Triệu chứng lâm sàng thiếu 17 α -hydroxylase/17,20 lyase là dấu hiệu nam hóa không hoàn toàn ở trẻ trai do giảm tổng hợp testosterone nên tinh hoàn không xuống bìu, các đặc tính sinh dục thứ phát kém phát triển. Ở trẻ nữ, các đặc tính sinh dục thứ phát không xuất hiện nên không có giai đoạn dậy thì do giảm tổng hợp estrogen. Cả nam và nữ gặp tăng huyết áp, giảm kali và tăng natri máu do tăng DOC tham gia chuyển hóa muối nước [1],[2]. Chẩn đoán xác định thiếu 17 α -hydroxylase/17,20 lyase dựa vào phân tích đột biến gen CYP17A1 [47],[48]. Phần lớn các đột biến được phát hiện là đột biến điểm gây giảm một phần hoạt tính enzym [49],[50].

Tăng sản thượng thận thể lipid hóa

Tăng sản thượng thận thể lipid hóa (*Lipoid adrenal hyperplasia*) là một thể TSTTBS rất nặng và hiếm gặp do không chuyển được cholesterol đến bất kỳ một vị trí nào để tổng hợp steroid ở tuyến vỏ thượng thận và tuyến sinh dục làm giảm đồng thời ba nhóm hormon steroid vỏ thượng thận gây suy thượng thận [51],[52].

Bệnh lý này rất ít gặp, dấu hiệu đặc trưng là mất muối (gặp ở cả nam và nữ), lưỡng giới giả ở trẻ nam do tinh hoàn không hạ xuống bìu nên bộ phận sinh dục ngoài giống nữ. Ở trẻ nữ, cơ quan sinh dục bên trong và bên ngoài đều là nữ nhưng không phát triển, không dậy thì và không có đặc tính sinh

dục phụ [1],[2]. Triệu chứng của TSTTBS thể lipid hóa giống với suy tuyến thượng thận bẩm sinh do thiếu hụt toàn bộ các hormon steroid thượng thận. Tuyến thượng thận tăng sản và chứa nhiều cholesterol và cholesterol este hóa [1],[2].

Tăng sản thượng thận bẩm sinh thể lipid hóa bao gồm hai dạng là thiếu hụt enzym 20,22-desmolase và thiếu hụt P450scc (cholesterol side chain cleavage enzyme). Đột biến gen StAR (trên nhiễm sắc thể 8p11.2) quy định tổng hợp protein StAR gây bất thường quá trình vận chuyển cholesterol từ ngoài vào trong ty thể hoặc bất thường P450scc trên gen CYP11A (nhiễm sắc thể 15q23-24) xúc tác phản ứng tách cholesterol khỏi protein vận chuyển. Đây là một bước quan trọng giới hạn sự tổng hợp hormon steroid và chịu tác động ACTH [3].

Xét nghiệm ở người bệnh tăng sản thượng thận thể lipid hóa thấy các hormon steroid trong máu và sản phẩm chuyển hóa trong nước tiểu giảm đồng thời với tăng ACTH trong máu, kali máu có thể cao hoặc bình thường và natri có thể thấp hoặc bình thường [3]. Phân tích gen StAR và P450scc giúp khẳng định chẩn đoán TSTTBS thể lipid hóa, tần xuất đột biến gen StAR phát hiện cao hơn gen P450scc [51],[52].

Thiếu Cytochrome P450 oxidoreductase

Thiếu *Cytochrome P450 oxidoreductase (POR)* là bệnh di truyền trên nhiễm sắc thể thường (nhiễm sắc thể 7q.11) do đột biến gen mã hóa flavoprotein làm nhiệm vụ chuyển electron đến các vi thể chứa enzym P450 tham gia tổng hợp cholesterol và hormon steroid gây giảm hoạt tính enzym như 21-OH, 17 α -hydroxylase, aromatase gây giảm tổng hợp cortisol, giảm androgen và dẫn đến TSTTBS và rối loạn phát triển giới tính [53]. Nguyên nhân gây thiếu POR chỉ thực sự được công nhận vào năm 2004, trước đó người bệnh thường được chẩn đoán là thiếu 21-OH hoặc thiếu aromatase [11],[54].

Triệu chứng lâm sàng thường gặp ở người bệnh thiếu POR là rối loạn

phát triển giới tính. Nam hóa trẻ nữ từ trong bào thai gây bộ phận sinh dục không rõ ràng do phì đại âm vật. Trẻ nam gặp dấu hiệu nam hóa không hoàn toàn như lỗ đái thấp, dương vật nhỏ, sự phát triển giới tính và dậy thì chậm, ít xuất hiện các đặc tính sinh dục phụ [53],[54].

Các xét nghiệm máu có thể thấy nồng độ ACTH bình thường hoặc cao, cortisol bình thường hoặc thấp và không đáp ứng với kích thích bằng ACTH trong khi nồng độ pregnenolone, progesterone, 17-OH pregnenolone, 17-OHP thấp trước và sau kích thích bằng ACTH. Nồng độ DHEA, DHEA-S, androstenedione bình thường hoặc giảm sau khi kích thích bằng ACTH, nồng độ androgen không đáp ứng với kích thích bằng hCG (human chorionic gonadotropin). Chẩn đoán thiếu POR có thể sử dụng phân tích steroid niệu bằng GC/MS với dấu hiệu của thiếu đồng thời 21-OH và thiếu 17-OH, phân tích đột biến gen POR giúp khẳng định chẩn đoán [54],[55].

1.3.2.2. Rối loạn tổng hợp corticoid chuyển hóa glucose và corticoid chuyển hóa muối nước

Bất thường trong bước cuối con đường tổng hợp các corticoid tham gia chuyển hóa glucose và corticoid chuyển hóa muối nước gây rối loạn nước điện giải gồm các bệnh lý sau:

- Thiếu enzym corticosterone methyl oxidase II.
- Bệnh cường aldosterone nhạy cảm với điều trị glucocorticoid.
- Thiếu enzym 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II.

Thiếu enzym corticosterone methyl oxidase II

Thiếu enzym corticosterone methyl oxidase II (CMO II) của tuyến thượng thận gây giảm tổng hợp aldosterone, biểu hiện là mất muối, mất nước ngay khi trẻ mới sinh, một số người bệnh có triệu chứng không đầy đủ. Xét nghiệm ngay sau khi sinh thấy tăng kali và giảm natri máu đồng thời với giảm aldosterone và tăng 18-OH corticosterone máu [56],[57]. Nguyên nhân chưa rõ ràng, có thể liên quan đến đột biến gen CYP11B2 mã hóa cho P450c11AS tổng hợp

aldosterone gây ra [58],[59].

Cường aldosterone nhạy cảm với điều trị glucocorticoid

Thông thường, chỉ quá trình tổng hợp glucocorticoid và androgen của tuyến thượng thận chịu điều hòa của ACTH, sự tổng hợp aldosterone không chịu sự điều hòa của ACTH mà chịu sự điều hòa của hệ renin-angiotensin-aldosterone. Bệnh cường aldosterone nhạy cảm với điều trị glucocorticoid (glucocorticoid suppressible hyperaldosteronism) là bệnh di truyền gen trội trên nhiễm sắc thể thường đặc trưng bởi rối loạn hormon chuyển hóa muối nước do tác động bất thường của ACTH lên tổng hợp aldosterone làm tăng nồng độ aldosterone gây tăng huyết áp [60],[61].

Triệu chứng lâm sàng cường aldosterone nhạy cảm với điều trị glucocorticoid xuất hiện tăng huyết áp, đau đầu, đây là bệnh có tính chất gia đình. Điều trị bệnh này bằng glucocorticoid như dexamethasone gây giảm tổng hợp ACTH qua đó ức chế bài tiết aldosterone, bệnh này có thể do u tuyến thượng thận lành tính gây ra [62].

Thiếu enzym 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2

Enzym 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD type 2) xúc tác phản ứng chuyển cortisol thành cortisone làm mất hoạt tính của cortisol. Thiếu enzym 11 β -HSD type 2 làm tăng nồng độ cortisol trong máu, do thời gian bán hủy của cortisol kéo dài gây ra hiện tượng cortisol gắn không đặc hiệu với thụ thể của aldosterone là hormon chuyển hóa muối nước. Đây là nguyên nhân gây ra hội chứng thừa hormon mineralocorticoid AME (apparent mineralocorticoid excess syndrome). Triệu chứng lâm sàng chính của bệnh là tăng huyết áp kèm theo hạ kali máu.

Sử dụng dexamethasone điều trị giúp ức chế bài tiết ACTH, giảm tổng hợp cortisol làm giảm triệu chứng rối loạn điện giải. Đột biến gen HSD11B2 nằm trên nhiễm sắc thể 16q22 quy định tổng hợp 11 β -HSD type 2 là nguyên nhân gây rối loạn điện giải do thiếu 11 β -HSD type 2 [63].

1.3.2.3. Rối loạn tổng hợp hormon sinh dục gây rối loạn phát triển giới tính

Bất thường ở bước cuối con đường sinh tổng hợp hormon sinh dục do thiếu enzym gây rối loạn phát triển giới tính. Các bệnh lý thuộc nhóm này không gây ra rối loạn sinh tổng hợp aldosterone và glucocorticoid nên không có triệu chứng TSTTBS và rối loạn điện giải. Một số bệnh lý thuộc nhóm bất thường sinh tổng hợp hormon sinh dục gồm:

- Thiếu enzym 5α -reductase type 2.
- Thiếu enzym 17,20-lyase.
- Thiếu enzym 17β -hydroxysteroid dehydrogenase 3.
- Thiếu enzym aromatase.

Thiếu enzym 5α -reductase type 2

Enzym 5α -reductase type 2 xúc tác phản ứng khử liên kết đôi giữa C4 và C5 của vòng A trên một số cơ chất như testosterone, cortisol và progesterone. Trong đó, quan trọng nhất là 5α -reductase type 2 xúc tác phản ứng chuyển testosterone thành 5α -dihydrotestosterone (5α -DHT). 5α -DHT có hoạt tính mạnh hơn hàng chục lần so với testosterone trên thụ thể của androgen làm phát triển cơ quan sinh dục (túi tinh, ống dẫn tinh, tinh hoàn) [64]. Thiếu 5α -reductase type 2 và không nhạy cảm với androgen là hai nguyên nhân thường gặp nhất gây ra rối loạn phát triển giới tính ở nam (nhiễm sắc thể 46,XY). Tần xuất mắc thiếu 5α -reductase type 2 cao ở một số nước như Cộng hòa Dominican, Thổ Nhĩ Kỳ và New Guinea [65],[66].

Mặc dù có bộ nhiễm sắc thể 46,XY nhưng người bệnh nam mắc thiếu 5α -reductase type 2 có bộ phận sinh dục ngoài kém phát triển gần giống với bộ phận sinh dục ngoài của nữ, nên nhiều người bệnh nam thiếu 5α -reductase type 2 khi mới sinh được cho là nữ. Người bệnh thiếu 5α -reductase type 2 có kiểu hình nữ gần như hoàn toàn hoặc cơ quan sinh dục ngoài không rõ ràng, lỗ đái thấp, dương vật nhỏ, bìu chia làm hai, có thể có âm đạo giả [65],[67]. Khi dậy thì, các đặc tính sinh dục phụ của nam xuất hiện như vỡ giọng, cơ bắp phát triển, dương vật phát triển, ngoại hình nam [68]. Ở trẻ nữ, thiếu hụt 5α -

reductase type 2 thường không biểu hiện lâm sàng, tuy nhiên có ca lâm sàng đơn lẻ thiếu 5 α -reductase type 2 ở nữ được mô tả với dấu hiệu vô kinh nguyên phát, vú kém phát triển [69].

Xét nghiệm máu ở người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 khi trưởng thành thấy nồng độ testosterone tăng cao hoặc bình thường và nồng độ 5 α -DHT thấp trước và sau khi kích thích bằng hCG [68]. Chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 dựa vào định lượng steroid niệu [64] thay cho kỹ thuật miễn dịch định lượng testosterone và DHT. Đến nay đã phát hiện khoảng 50 loại đột biến khác nhau của gen SRD5A2 (2p.23) gây giảm hoạt tính enzym 5 α -reductase type 2 giúp khẳng định chẩn đoán.

Thiếu enzym 17,20-lyase

Enzym 17,20-lyase xúc tác phản ứng chuyển 17 α -OH pregnenolone thành DHEA - tiền chất để tổng hợp nên các hormon sinh dục androgen và estrogen. Thiếu 17,20-lyase kết hợp với thiếu 17 α -hydroxylase do cả hai enzym này đều do Cyt P450c17 có đồng thời hai hoạt tính enzym. Thiếu enzym 17,20-lyase dẫn đến lưỡng giới giả ở trẻ trai với sự thay đổi ở cơ quan sinh dục không điển hình của nam giới, mặc dù nhiễm sắc thể là 46,XY nhưng tinh hoàn không xuống bìu [70]. Nguyên nhân do đột biến gen CYP17A1 làm giảm Cyt P450c17 gây TSTTBS và RLPTGT.

Thiếu enzym 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3

Enzym 17 β -HSD type 3 do gen HSD17B3 quy định xúc tác phản ứng tổng hợp testosterone từ androsterone và tổng hợp androstenedione từ DHEA. Thiếu hụt 17 β -HSD type 3 gây giảm tổng hợp testosterone, 5 α -DHT nên dấu hiệu nam hóa không hoàn toàn ở người mang nhiễm sắc thể 46,XY [71].

Tần xuất thiếu 17 β -HSD type 3 chưa được biết rõ ở nhiều nước. Triệu chứng lâm sàng biểu hiện ở trẻ trai với dấu hiệu nữ hóa một phần đến hoàn toàn tùy mức độ thiếu enzym: ngoại hình nữ, bộ phận sinh dục không rõ ràng, vô

kinh nguyên phát, xuất hiện dấu hiệu nam hóa khi dậy thì. Về di truyền, enzym 17β -HSD có rất nhiều gen mã hóa khác nhau cho các isozym khác nhau. Đến nay đã có khoảng 14 isozym của 17β -HSD được phát hiện đánh số từ HSD17B1 đến HSD17B14 trong đó ít nhất 7 isozym có hoạt tính chuyển đổi qua lại giữa 17-ketosteroid và 17β -hydroxysteroid. Trong đó thiếu hụt 17β -HSD type 3 do đột biến gen HSD17B3 (NST 9q22.32) là nguyên nhân gây ra rối loạn phát triển giới tính ở nam (nhiễm sắc thể 46,XY) [72],[73].

Xét nghiệm trước và sau khi tiêm kích thích bằng hCG cho thấy nồng độ androstenedione tăng cao và testosterone thấp. Chẩn đoán xác định thiếu 17β -HSD type 3 bằng phân tích đột biến gen HSD17B3.

Thiếu enzym aromatase

Aromatase xúc tác phản ứng chuyển androstenedione thành estron và chuyển testosterone thành estradiol. Bệnh rất hiếm gặp, do đột biến gen CYP19A1 trên nhiễm sắc thể 15q21.1.

Triệu chứng lâm sàng ở người bệnh thiếu aromatase ở nữ sẽ dẫn đến chậm phát triển thể chất và chậm dậy thì, biểu hiện các mức độ khác nhau về đặc tính sinh dục thứ phát do thiếu estrogen và thừa androgen như mọc mụn trứng cá khi dậy thì. Ở nam, các triệu chứng không rõ ràng, chiều cao và cân nặng phát triển hơn bình thường [74].

Xét nghiệm thấy nồng độ estrogen trong máu giảm ở mọi lứa tuổi, LH và FSH tăng cao ở người trưởng thành [1],[2]. Phân tích đột biến gen CYP19A1 giúp khẳng định chẩn đoán thiếu aromatase [75].

1.3.2.4. Bất thường tại thụ thể của hormon steroid.

Bất thường tại thụ thể của hormon steroid gây bệnh cảnh lâm sàng giống với bệnh lý rối loạn tổng hợp hormon steroid. Thuộc nhóm này bao gồm hội chứng không nhạy cảm với androgen (androgen insensitivity syndrome) gây nữ hóa trẻ nam có nhiễm sắc thể 46,XY do đột biến gen AR [76],[77]. Bất

thường thụ thể estrogen ở bệnh nhân nam 28 tuổi gây tăng chiều cao, tăng nồng độ estrogen trong máu [78], gây chậm dậy thì ở bệnh nhân nữ do đột biến gen ESR1 [79],[80]. Hội chứng kháng glucocorticoid do bất thường thụ thể glucocorticoid gây tăng tiết ACTH, rối loạn điện giải, tăng tổng hợp androgen [81]. Kháng progesterone bẩm sinh do bất thường thụ thể progesterone là bệnh hiếm gặp, trong khi kháng progesterone có thể gặp mắc phải do một số nguyên nhân [82].

1.3.3. Ứng dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS trong chẩn đoán rối loạn tổng hợp hormon steroid bẩm sinh

Kỹ thuật GC/MS định lượng steroid niệu dùng để chẩn đoán xác định các rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid có từ những năm 1979, không ngừng phát triển, được ứng dụng trong chẩn đoán nhiều bệnh lý sinh tổng hợp hormon steroid với nhiều ưu điểm nổi trội so với kỹ thuật miễn dịch. Bằng các tỷ lệ chẩn đoán, Krone N và cộng sự công bố có thể sử dụng GC/MS để định lượng steroid niệu như một tiêu chuẩn vàng giúp chẩn đoán các bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid như thiếu 21-OH, thiếu 11 β -OH, thiếu 3 β -HSD II, thiếu 17-OH, thiếu 5 α -reductase type 2, trong đó có những bệnh lý ít gặp mà trước đây thường nhầm với bệnh khác như thiếu POR [11]. Nhờ sự xác định chính xác các sản phẩm chuyển hóa steroid trong nước tiểu, nhiều sản phẩm mới được tìm ra, cả một con đường mới sinh tổng hợp androgen được tìm ra (con đường cạnh). Nhờ vậy, chúng ta hiểu rõ hơn cơ chế tăng tổng hợp androgen ở người bệnh mắc rối loạn sinh tổng hợp steroid như thiếu 21-OH [83], thiếu POR [84].

Định lượng steroid niệu bằng GC/MS có nhiều ưu điểm nhờ chuẩn bị mẫu qua nhiều bước trong đó có quá trình thủy phân, tạo dẫn xuất, tách chiết steroid tự do và quá trình sắc ký khí với thời gian dài hơn so với sắc ký lỏng khối phổ.

Nhờ vậy, sắc ký khí khối phổ có khả năng phân tách các đồng phân của steroid trong mẫu, mỗi steroid được đặc trưng bằng một đỉnh trên sắc ký đồ. Kỹ thuật định lượng steroid niệu đạt độ nhạy và độ đặc hiệu cao, giúp chẩn đoán nhiều bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid bẩm sinh cũng như mắc phải [11],[18].

Tùy theo từng bệnh lý thiếu hụt enzym mà các tác giả sử dụng các tiêu chí khác nhau để giúp chẩn đoán xác định và phân biệt các bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid. Hơn nữa, tùy thuộc tuổi của người bệnh mà lựa chọn steroid niệu đặc hiệu. Khi ứng dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS cho trẻ sơ sinh cần lưu ý có sự khác biệt nồng độ các sản phẩm chuyển hóa steroid niệu theo tuổi thai và trọng lượng cơ thể mà khoảng tham chiếu cũng cần xây dựng riêng cho trẻ sơ sinh đủ tháng và sơ sinh thiếu tháng hoặc nhẹ cân [85]. Ở trẻ trên 8 tuổi Honour JW thấy có sự liên quan giữa sự bài tiết androgen và cortisol với trọng lượng cơ thể, chiều cao đồng thời có sự khác biệt nồng độ steroid niệu giữa trẻ nam và nữ ở độ tuổi này [86] hoặc liên quan đến sự phát triển cơ thể thể hiện qua tỷ trọng xương [87].

Chỉ định xét nghiệm định lượng steroid niệu rất hữu ích trong chẩn đoán với các trường hợp không phân biệt giới tính ở trẻ sơ sinh do bộ phận sinh dục không rõ ràng, trường hợp có dấu hiệu nam hóa ở trẻ nữ, những trường hợp nam hóa không hoàn toàn ở trẻ nam hay các rối loạn nước điện giải trong đó nhiều trường hợp do TSTTBS, RLPTGT [88],[89]. Ngày nay, kỹ thuật định lượng steroid bằng GC/MS được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán các bệnh khác như dậy thì sớm, vô kinh nguyên phát, hội chứng Cushing, bệnh khối u thượng thận, hội chứng buồng trứng đa nang, tăng huyết áp, rối loạn nước- điện giải, chứng rụng lông...[89],[90].

1.3.3.1. Ứng dụng trong chẩn đoán thiếu 21-OH

Thiếu 21-OH gây tăng nồng độ 17-OHP và 21-deoxycortisol trong máu, dẫn tới làm tăng nồng độ 17-hydroxypregnanolone (17OHPN), PT và pregnanetriolone (PTL) trong nước tiểu. Xét nghiệm định lượng steroid niệu bằng GC/MS cho thấy mẫu hình điển hình trên sắc ký đồ người bệnh thiếu 21-OH có xuất hiện các đỉnh 17OHPN và PTL mà mẫu bình thường không có hoặc rất thấp. Nồng độ 17OHPN, PT, PTL và các tỷ lệ chẩn đoán $17OHPN/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$, $PT/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$, $PTL/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$ cao hơn so với khoảng tham chiếu [11]. Các tỷ lệ chẩn đoán này được Lucas-Herald và cộng sự thiết lập khoảng tham chiếu và ứng dụng chẩn đoán cho nhiều người bệnh mắc rối loạn sinh tổng hợp steroid [88]. Ở trẻ sơ sinh, tỷ lệ $PTL/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$ và tỷ lệ $PTL/6\alpha\text{OH-THE}$ cao là tiêu chuẩn chẩn đoán đặc hiệu nhất của thiếu enzyme 21-OH [12],[85].

1.3.3.2. Ứng dụng trong chẩn đoán thiếu 11 β -OH

Thiếu 11 β -OH gây tăng nồng độ DOC và 11-deoxycortisol trong máu dẫn đến tăng nồng độ THS trong nước tiểu. Xét nghiệm định lượng steroid niệu bằng kỹ thuật GC/MS ở người bệnh thiếu 11 β -OH đặc trưng bằng sự xuất hiện đỉnh THS trên sắc ký đồ mà mẫu bình thường rất thấp. Nồng độ THS và tỷ lệ $THS/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$ cao hơn so với khoảng tham chiếu gợi ý giảm enzym 11 β -OH [11],[51]. Ở trẻ sơ sinh, có thể thấy xuất hiện các dạng đồng phân của THS như hexahydro 11-deoxycortisol (HHS), 6-OH THS. Tăng tỷ lệ THS và 6 α -OH-THS so với sản phẩm chuyển hóa của cortisol ở người bệnh được chẩn đoán thiếu 11 β -OH [7]. Mẫu hình sắc ký đồ đặc trưng của người bệnh thiếu 11 β -OH được Chan OK mô tả trong nghiên cứu TSTTBS, RLPTGT tại Hồng Kông với đỉnh THS cao [8] cũng như trong các công bố khác [40].

1.3.3.3. Ứng dụng trong chẩn đoán thiếu 3 β -HSD type II

Thiếu 3 β -HSD type II làm tăng nồng độ DHEA và DHEA-S trong máu. Xét nghiệm định lượng steroid niệu bằng kỹ thuật GC/MS thấy mẫu hình đặc trưng là tăng nồng độ DHEA và tăng tỷ lệ DHEA/(THE +THF +5 α -THF), 5PT/(THE +THF +5 α -THF) so với khoảng tham chiếu [11]. Tuy nhiên, ở người bệnh thiếu 21-OH và 11 β -OH cũng tăng tổng hợp androgen nên làm tăng nồng độ DHEA. Vì vậy, cần phân biệt tăng DHEA ở người bệnh thiếu 21-OH và 11 β -OH với thiếu 3 β -HSD type II.

1.3.3.4. Ứng dụng trong chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2

Xét nghiệm định lượng steroid niệu bằng GC/MS rất hữu ích trong chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2, sắc ký đồ có mẫu hình đặc trưng là đỉnh 5 α -THF thấp hơn nhiều so với đỉnh THF do vậy tỷ lệ 5 α -THF/THF thấp hơn giá trị tham chiếu [8],[64] hoặc tỷ lệ THF/5 α -THF cao hơn khoảng tham chiếu [11]. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng chỉ ra tỷ lệ An/Et, 11OH-An/11OH-Et, 5 α -THB/THB thấp hơn khoảng tham chiếu ở trẻ lớn [64]. Kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS là tiêu chuẩn chẩn đoán quan trọng thiếu 5 α -reductase type 2 thay thế cho kỹ thuật định lượng testosterone và dihydrotestosterone bằng phương pháp miễn dịch có độ nhạy thấp hơn và bị nhiễu. Tuy vậy, Chan OK nhận thấy khó chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 ở trẻ dưới 3 tháng tuổi do sự bài tiết các hormon steroid rất thấp, nên ở trẻ dưới 3 tháng cần phân tích đột biến gen SRD5A2 để chẩn đoán [64].

1.3.3.5. Ứng dụng trong chẩn đoán bệnh lý rối loạn tổng hợp steroid khác

Ứng dụng trong chẩn đoán thiếu 17 α -OH/17,20-lyase.

Xét nghiệm máu ở người bệnh thiếu 17 α -hydroxylase/17,20-lyase có thể thấy nồng độ cortisol, testosterone thấp, natri cao, kali thấp do tăng hoạt tính aldosterone. Xét nghiệm định lượng steroid niệu bằng GC/MS cho thấy tỷ lệ

$(\text{THA}+5\alpha\text{-THA}+\text{THB} + 5\alpha\text{-THB})/(\text{THE}+\text{THF}+5\alpha\text{-THF})$ và tỷ lệ $(\text{THA}+5\alpha\text{-THA}+\text{THB}+5\alpha\text{-THB})/(\text{An} + \text{Et})$ cao hơn khoảng tham chiếu [11].

Ứng dụng trong chẩn đoán thiếu POR

Những người bệnh mắc thiếu hụt POR được chẩn đoán dựa trên kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS với đặc trưng thiếu đồng thời $17\alpha\text{-OH}$ và 21-OH và được khẳng định bằng phân tích gen POR. Krone N nhận thấy ở người bệnh thiếu POR có 5 tỷ lệ chẩn đoán đặc trưng là $(17\text{OHPN} + \text{PT})/(\text{An} + \text{Et})$; $(17\text{OHPN} + \text{PT})/(\text{THE} + \text{THF} + 5\alpha\text{-THF})$; $\text{PD}/(\text{THE} + \text{THF} + 5\alpha\text{-THF})$, $5\text{PD}/(\text{THE} + \text{THF} + 5\alpha\text{-THF})$, $(\text{THA} + 5\alpha\text{-THA} + \text{THB} + 5\alpha\text{-THB})/(\text{THE} + \text{THF} + 5\alpha\text{-THF})$ [11]. Chẩn đoán thiếu hụt POR bằng định lượng steroid niệu rất hiệu quả, trước đây khi chưa có kỹ thuật này, nhiều người bệnh bị chẩn đoán nhầm với thiếu 21-OH hoặc thiếu aromatase. Fumaki M công bố 3 trường hợp ban đầu được chẩn đoán thiếu 21-OH và thiếu aromatase dựa vào nồng độ 17-OHP và dấu hiệu lâm sàng, nhưng khi định lượng steroid niệu bằng GC/MS đã chẩn đoán thiếu POR và đã được khẳng định bằng đột biến gen POR [55]. Dựa vào kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS, nhiều sản phẩm chuyển hóa mới tăng ở mẫu thiếu POR từ đó đã xác định được con đường cạnh tăng tổng hợp dihydrotestosterone ở bệnh nhân thiếu POR [84].

Ứng dụng trong chẩn đoán thiếu corticosterone methyl oxidase II

Chẩn đoán thiếu corticosterone methyl oxidase type II (CMO II) gây rối loạn điện giải, tăng huyết áp dựa trên kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS với dấu hiệu tăng tỷ lệ $18\text{OH-THA}/\text{THA}$ [11]. Định lượng nồng độ $18\text{-hydroxycortisol}$ bằng kỹ thuật miễn dịch (RIA: radioimmunoassay), DELFIA (time-resolved fluorometric) bị nhiễu do phản ứng chéo với cortisol nên kém chính xác so với kỹ thuật GC/MS [91].

Ứng dụng trong chẩn đoán thiếu 11 β -HSD type 2

Kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS giúp chẩn đoán thiếu enzym 11 β -HSD type 2 gây ra hội chứng thừa mineralocorticoids (AME) với biểu hiện tăng huyết áp, hạ kali, giảm hoạt tính hệ renin –angiotensin [92]. Chẩn đoán AME dựa vào kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS cho thấy sản phẩm chuyển hóa của cortisone là THE thấp hơn các sản phẩm chuyển hóa của cortisol là THF, 5 α -THF. Chẩn đoán AME dựa vào tỷ lệ THE/THF thấp hoặc sử dụng các tỷ lệ như (THF +5 α -THF)/THE; Cortols/Cortolones cao hơn khoảng tham chiếu [11],[93].

Ứng dụng trong chẩn đoán thiếu 17 β -HSD type 3

Thiếu 17 β -HSD type 3 gây rối loạn phát triển giới tính ở nam do giảm tổng hợp hormon sinh dục nam như androstenediol, testosterone nên giảm bài tiết các sản phẩm chuyển hóa của androgen trong nước tiểu. Chẩn đoán thiếu 17 β -HSD type 3 bằng kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS có thể thấy tỷ lệ (An + Et)/(THE +THF +5 α -THF) thấp hơn khoảng tham chiếu [11].

Ứng dụng trong chẩn đoán ACRD (apparent cortisone reductase deficiency).

Thiếu enzym cortisone reductase xúc tác phản ứng thuận nghịch chuyển cortisone thành cortisol gây tăng nồng độ cortisone trong máu, tăng tỷ lệ sản phẩm chuyển hóa của cortisone so với cortisol trong nước tiểu. Chẩn đoán ACRD bằng định lượng steroid niệu sử dụng tỷ lệ THE/(THF + 5 α -THF) hoặc tỷ lệ Cortolones/Cortols [11].

Ứng dụng trong chẩn đoán bệnh lý mắc phải của tuyến thượng thận.

Bên cạnh ứng dụng trong chẩn đoán nhiều bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid bẩm sinh, kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS được ứng dụng trong chẩn đoán bệnh lý mắc phải của tuyến thượng thận như khối u thượng thận vùng vỏ, hội chứng Addison, hội chứng Cushing. Trong đó, sự

tăng bài tiết THS so với các sản phẩm của cortisol là dấu hiệu hữu ích cho chẩn đoán ung thư tuyến thượng thận và phân biệt với u lành tính và người khỏe mạnh. Giá trị điểm cắt của THS là $2,35 \mu\text{mol}/24$ giờ có độ nhạy 100% và độ đặc hiệu 99% để chẩn đoán ung thư tuyến thượng thận [94]. Khối u tuyến thượng thận bài tiết không chọn lọc các hormon steroid, sự khác biệt giữa các người bệnh mắc khối u thượng thận được mô tả khi định lượng steroid niệu, một số trường hợp tăng tiết không chọn lọc cả 3 nhóm hormon steroid trong đó có tăng THS [95], một số trường hợp tăng tiết DOC, progesterone [96]. Bằng kỹ thuật GC/MS đã xác định được ở người bệnh mắc hội chứng Cushing có tăng tổng hợp $3\alpha, 11\beta$ -Dihydroxy-4-Androsten-17-one do xuất hiện đỉnh bất thường trên sắc ký đồ [97].

Kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS phân biệt được các steroid nội sinh tổng hợp tại tuyến thượng thận, sinh dục với các loại thuốc chứa corticoid (anabolic steroids drugs) nhờ phân tích cấu trúc đặc hiệu cho từng steroid và thời gian lưu khác nhau. Vì vậy, định lượng steroid niệu bằng GC/MS còn giúp phát hiện và định lượng các steroid tổng hợp sử dụng trong điều trị cũng như các loại doping trong thể thao [98],[99],[100]. Ủy ban Olympic sử dụng định lượng steroid niệu bằng GC/MS để phát hiện các vận động viên dùng testosterone ngoại sinh như doping nhờ phân biệt testosterone nội sinh và epitestosterone [101]. Trong y học, sử dụng hormon thay thế ở phụ nữ mãn kinh cần được theo dõi trước và sau điều trị, định lượng estriol bằng GC/MS hữu ích vì phân biệt được estriol nội sinh với ngoại sinh [102]

Tóm lại, kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS có nhiều ưu điểm như mẫu không xâm nhập, độ nhạy cao, độ đặc hiệu cao. Tuy nhiên, vẫn còn những hạn chế đặc biệt ở trẻ sơ sinh, cũng như không thể chẩn đoán được các nguyên nhân khác gây rối loạn phát triển giới tính như không nhạy cảm với androgen, bất thường khác ở thụ thể của hormon steroid. Vì vậy, việc lựa chọn

các xét nghiệm máu bằng kỹ thuật hiện đại có độ nhạy, độ đặc hiệu cao như HPLC, kết hợp với định lượng steroid niệu hữu ích trong chẩn đoán bệnh lý tuyến thượng thận [103]. Việc lựa chọn kỹ thuật hỗ trợ phù hợp là rất quan trọng trong chẩn đoán các bệnh lý tuyến thượng thận, tùy thuộc vào đối tượng cần chẩn đoán và ưu nhược điểm của từng kỹ thuật, giúp chẩn đoán ngay từ giai đoạn trước sinh, ngay sau khi sinh và đến khi trưởng thành. Ứng dụng các kỹ thuật giúp chẩn đoán các bệnh lý kết hợp, giải thích nguyên nhân, cơ chế bệnh sinh, triệu chứng lâm sàng, theo dõi điều trị.

1.3.4. Một số kỹ thuật khác sử dụng trong chẩn đoán rối loạn tổng hợp hormon steroid

1.3.4.1. Kỹ thuật miễn dịch

Kỹ thuật miễn dịch thường được dùng phổ biến trong các phòng xét nghiệm hiện nay nhằm định lượng từng hormon steroid hoặc tiền chất riêng lẻ. Cơ chế là phản ứng miễn dịch đặc hiệu giữa kháng nguyên là các hormon cần định lượng và kháng thể đơn dòng đặc hiệu với các kháng nguyên trên. Kỹ thuật miễn dịch được thực hiện thường quy nhờ các hệ thống máy miễn dịch có công suất lớn, thời gian phân tích nhanh, giá thành hợp lý và không đòi hỏi người sử dụng phải được đào tạo chuyên biệt.

Kỹ thuật miễn dịch được ứng dụng trong định lượng nhiều hormon giúp nhận định ban đầu về bệnh lý tuyến thượng thận và sinh dục bao gồm testosterone, estradiol, cortisol, ACTH, androstenedione, 17-OHP. Phương pháp có độ nhạy cao với thời gian phân tích nhanh được áp dụng rộng rãi tại nhiều phòng xét nghiệm. Tuy nhiên, các kỹ thuật miễn dịch định lượng steroid huyết thanh có thể bị ảnh hưởng bởi các steroid nguồn gốc từ nhau thai, từ mẹ truyền sang ở trẻ sơ sinh [22]. Phản ứng chéo giữa hormon steroid với các tiền chất có cấu trúc kháng nguyên tương tự. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng định lượng kém chính xác nồng độ cortisol ở người bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH, thiếu 11 β -OH do phản ứng chéo giữa 11-deoxycortisol với

kháng thể kháng cortisol gây tăng giả tạo nồng độ cortisol [38].

1.3.4.2. Kỹ thuật sắc ký lỏng-khối phổ

Sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (*LC/MS-MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) kết hợp giữa sắc ký lỏng để phân tách các thành phần trong mẫu thử và khối phổ nhằm định lượng các chất trong hỗn hợp sau khi ion hóa sản phẩm sắc ký. Lần đầu tiên, kỹ thuật LC/MS-MS được sử dụng để đo lường acylcarnitine. Sau đó, kỹ thuật LC/MS-MS được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán bệnh lý liên quan đến bất thường về nồng độ nhiều chất và sản phẩm chuyển hóa khác nhau trong huyết thanh như: carnitine toàn phần và tự do, phenylalanine, tyrosine, methionine, homocystein, sulfocysteine, pyrimidines, acyglycines, acid mật, các hormon steroid [11].

Sắc ký lỏng áp lực cao kết hợp khối phổ (HPLC-MS) được sử dụng để định lượng các hormon và tiền chất trong máu với độ nhạy cao. Sắc ký lỏng áp lực cao giúp phân tách các thành phần trong mẫu thử, khối phổ giúp định tính và định lượng các thành phần. Sự kết hợp này đem lại hiệu quả cao hơn kỹ thuật miễn dịch thông thường do phân tích được nhiều sản phẩm trong một lần và độ đặc hiệu cao hơn, khắc phục được hiện tượng nhiễu do phản ứng chéo nên được sử dụng rộng hơn trong chẩn đoán bệnh lý tuyến thượng thận [103].

Kỹ thuật LC/MS-MS và HPLC-MS có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn các kỹ thuật miễn dịch, thời gian phân tích ngắn do không phải thủy phân steroid liên hợp và dẫn xuất hóa. Kỹ thuật này dễ dàng tự động được nhiều phòng xét nghiệm chấp nhận sử dụng trên thế giới trong sàng lọc các bệnh chuyển hóa, có khả năng phân tích nhiều mẫu bệnh phẩm, có thể lên đến 500 mẫu/ ngày. Tuy nhiên, kỹ thuật này sử dụng mẫu máu nên có hạn chế khi chỉ phản ánh thay đổi nồng độ steroid tại thời điểm lấy mẫu. Đồng thời do thời gian sắc ký lỏng ngắn nên LC/MS-MS chưa tách được các dạng đồng phân của chất phân tích.

1.3.4.3. Kỹ thuật phân tích gen và cơ sở phân tử bệnh TSTTBS, RLPTGT

Việc phân tích gen và đột biến gen có thể cho biết nguyên nhân, cơ chế

sinh lý bệnh của rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid và là kỹ thuật khẳng định chẩn đoán. Khi đột biến gen quy định tổng hợp các enzym xúc tác phản ứng tổng hợp hormon steroid gây giảm một phần hoặc hoàn toàn hoạt tính enzym đó và làm giảm tổng hợp hormon steroid ở phía sau vị trí do enzym xúc tác. Đồng thời làm tăng tiền chất phía trước enzym thiếu hụt, tăng tổng hợp và bài tiết hormon ACTH tuyến yên gây tăng sản tuyến thượng thận, tăng sản xuất hormon theo con đường khác. Đây là cơ sở phân tử của bệnh TSTTBS, RLPTGT mà nhiều nhà khoa học nghiên cứu, phát hiện ngày càng nhiều đột biến gen gây giảm hoạt tính enzym tương ứng. Một số bệnh lý rối loạn tổng hợp steroid được phân tích các gen tương ứng như sau:

Phân tích gen CYP21A2 để chẩn đoán thiếu 21 α -hydroxylase.

Phân tích gen CYP11B1 để chẩn đoán thiếu 11 β -hydroxylase

Phân tích gen CYP17A1 để chẩn đoán thiếu 17 α -hydroxylase/17,20 lyase.

Phân tích gen CYP11B2 để chẩn đoán thiếu aldolase synthetase.

Phân tích gen CYP19A1 để chẩn đoán thiếu aromatase.

Phân tích gen SRD5A2 để chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2...

Tuy nhiên, do các dạng đột biến gen rất đa dạng như đột biến mất đoạn, đột biến điểm, đột biến lặp đoạn nên kỹ thuật phân tích gen vẫn đang được tiếp tục nghiên cứu ứng dụng nhằm phát hiện đầy đủ bất thường về gen. Hiện nay, ước tính có khoảng 127 đột biến khác nhau trên gen CYP21A2 quy định tổng hợp enzym 21-OH gây nên thiếu hụt hoạt độ enzym này cả thể cổ điển và không cổ điển [30]. Khoảng 60 loại đột biến khác nhau trên gen CYP11B1 được phát hiện ở người bệnh TSTTBS do thiếu 11 β -OH [9]. Khoảng 50-60 loại đột biến SRD5A2 gây thiếu 5 α -reductase type 2 đã được phát hiện. Các bệnh lý thiếu enzym khác tham gia tổng hợp hormon steroid được nghiên cứu và phát hiện các loại đột biến gen khác nhau. Phân tích đột biến gen có tác dụng giúp chẩn đoán các thể bệnh rối loạn tổng hợp hormon steroid đặc biệt với thể không cổ điển và trẻ sơ sinh.

1.4. Nghiên cứu về rối loạn tổng hợp hormon steroid bẩm sinh ở Việt Nam

Rối loạn tổng hợp hormon steroid bẩm sinh được nghiên cứu tại Việt Nam từ những năm 1970 đến nay [104],[105]. Trước năm 1999, các nghiên cứu về bệnh lý rối loạn sinh tổng hormon steroid tập trung vào những nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm máu, biến chứng suy thượng thận ở người bệnh có dấu hiệu của TSTTBS. Trong đó chẩn đoán TSTTBS ở trẻ em với các dấu hiệu lâm sàng và định lượng nồng độ 17-OHP trong máu [106], kết hợp với tăng nồng độ progesterone, tăng kali, testosterone, 17-ketosteroid, hạ natri [107]. Việc chẩn đoán bằng các tiêu chuẩn không đặc hiệu có thể dẫn tới chẩn đoán nhầm TSTTBS hoặc bị bỏ sót do nồng độ 17-OHP và testosterone không cao. Người bệnh TSTTBS cũng được theo dõi điều trị bằng 17-OHP nhằm phát hiện các biến chứng suy thượng thận cấp có thể gây tử vong cho người bệnh [108],[109]. Từ 1/1/2006 đến 31/12/2010 có 52 người bệnh suy thượng thận cấp do TSTTBS được điều trị tại khoa Nội tiết- Chuyển hóa- Di truyền [110].

Từ 1999 đến nay, nhiều nghiên cứu đột biến gen ở người bệnh TSTTBS được công bố như đột biến mất đoạn 8 nucleotid ở exon 3 trên gen CYP21 [111],[112], một số đột biến điểm bên cạnh đột biến mất đoạn 8 nucleotid ở exon 3 [113]. Tuy nhiên việc sử dụng ít cặp môi để phát hiện các đột biến thường gặp mà chưa giải trình tự toàn bộ gen CYP21A2 nên chỉ có 24/43 (55,8%) người bệnh phát hiện được đột biến, còn 19 (44,2%) người bệnh có triệu chứng TSTTBS chưa phát hiện đột biến gen CYP21.

Năm 2017, Vũ Chí Dũng và cộng sự công bố kết quả phân tích gen CYP21A2 được thực hiện cho 212 người bệnh có đột biến nhằm chẩn đoán thiếu 21-OH, 11 người bệnh phát hiện TSTTBS do thiếu 11 β -OH, 3 người bệnh thiếu 3 β -HSD II [13]. Một trường hợp TSTTBS do thiếu 21-OH không được chẩn đoán, điều trị sớm và đầy đủ được phát hiện có u vỏ thượng thận [114].

Năm 2012, Phạm Thu Nga nghiên cứu trong số 695 người bệnh có rối loạn phát triển giới tính có 51,7% người bệnh là nữ mang nhiễm sắc thể 46,XX phân

lớn do TSTTBS chiếm 91,9%. 25% rối loạn phát triển giới tính ở người bệnh mang nhiễm sắc thể 46,XY trong đó 8,1% mắc không nhạy cảm với androgen [17].

Từ 2012-đến nay, một số công bố phát hiện đột biến gen CYP11B1 giúp chẩn đoán xác định người bệnh mắc TSTTBS do thiếu 11β -OH trong đó phát hiện một số đột biến mới [15],[115].

Số lượng người bệnh mắc TSTTBS và rối loạn phát triển giới tính được phát hiện ngày càng nhiều, đến nay mỗi năm có 50-70 người bệnh được khám và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Đây là số lượng người bệnh rất lớn đòi hỏi kỹ thuật chẩn đoán nhanh, đặc hiệu, giúp theo dõi điều trị và chẩn đoán phân biệt thể bệnh khác nhau của TSTTBS, RLPTGT. Mặc dù đã có kỹ thuật phân tích gen giúp chẩn đoán thiếu 21-OH và 11β -OH tuy nhiên còn rất nhiều bệnh lý khác đặc biệt là RLPTGT ở người mang nhiễm sắc thể 46,XY chưa được chẩn đoán xác định tại Việt Nam như thiếu 5α -reductase type 2, thiếu 3β -HSD II nên phải hợp tác và gửi mẫu phân tích ra nước ngoài như Nhật Bản, Pháp [116],[117].

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Nhóm chứng

269 trẻ khỏe mạnh từ 1 ngày tuổi đến 11 tuổi chia làm 4 nhóm tuổi, đảm bảo số mẫu trong mỗi nhóm đạt ≥ 39 [25]:

Nhóm 1: 64 trẻ từ 1 ngày đến 28 ngày tuổi.

Nhóm 2: 61 trẻ từ 1 tháng (≥ 29 ngày) đến < 2 tuổi.

Nhóm 3: 74 trẻ từ 2 tuổi đến < 8 tuổi.

Nhóm 4: 70 trẻ từ 8 - ≤ 11 tuổi.

Giới tính: nam và nữ tương đương nhau.

Tiêu chuẩn lựa chọn: trẻ khỏe mạnh từ 1 ngày đến 11 tuổi. Trong đó sơ sinh đủ tháng theo tiêu chuẩn của WHO với tuổi thai 37-42 tuần, cân nặng khi sinh > 2500 g. Toàn bộ trẻ khỏe mạnh không có dấu hiệu mắc TSTTBS, RLPTGT (sạm da, mất nước, bất thường ở bộ phận sinh dục), tiền sử gia đình không có trẻ mắc TSTTBS và RLPTGT, không sử dụng các thuốc có corticoid trong vòng 1 tháng, được sàng lọc qua phiếu điều tra (mẫu trong phụ lục 2a). Trẻ và hoặc gia đình cam kết tự nguyện tham gia nghiên cứu (theo mẫu trong phụ lục 1).

Tiêu chuẩn loại trừ: gia đình và hoặc trẻ không đồng ý tham gia nghiên cứu hoặc trẻ có một trong các dấu hiệu lâm sàng nghi ngờ mắc TSTTBS hoặc rối loạn phát triển giới tính. Trong gia đình có trẻ đã chẩn đoán TSTTBS, RLPTGT. Những trẻ được điều trị bằng corticoid trong vòng 1 tháng đến khi lấy mẫu, được phát hiện qua phiếu điều tra (phụ lục 2a).

Địa điểm lấy mẫu: Mẫu của trẻ sơ sinh được thu thập tại Khoa Sản Bệnh viện Đa khoa tỉnh Vĩnh Phúc. Mẫu của trẻ < 2 tuổi thu thập tại trung tâm y tế

xã hoặc phường tại Vĩnh Phúc trước khi trẻ được tiêm chủng. Mẫu của trẻ 2-5 tuổi được thu thập tại các trường mẫu giáo tại Vĩnh Phúc. Mẫu của trẻ 6-≤11 tuổi thu thập tại trường Tiểu học Kim Liên (Đống Đa – Hà Nội).

2.1.2. Nhóm bệnh

200 người bệnh nghi ngờ mắc rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid bẩm sinh gây TSTTBS, RLPTGT được các bác sỹ khoa Nội tiết – Chuyển hóa – Di truyền chẩn đoán.

Địa điểm: phòng khám và khoa Nội tiết – Chuyển hóa –Di truyền Bệnh viện Nhi trung ương và khoa Phẫu thuật Nhi- Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức.

Tiêu chuẩn lựa chọn khi có một hoặc nhiều dấu hiệu sau:

- ✓ *Người bệnh TSTTBS*: Tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm dựa vào tiêu chuẩn của New MI công bố [3].

Triệu chứng lâm sàng: người bệnh có bộ phận sinh dục không rõ ràng khó phân biệt là nam hay nữ do phì đại âm vật, môi lớn nhăn nheo sẫm màu, không thấy tinh hoàn, lỗ đái thấp. Trẻ nam có dấu hiệu dậy thì sớm (dương vật to lên nhanh, mọc lông mu, có mùi cơ thể, thay đổi giọng nói). Cả nam và nữ có dấu hiệu sạm da, mắt nước (da khô, thóp lõm, chậm hoặc không tăng cân hoặc giảm cân, nôn, tiêu chảy).

- ✓ *Người bệnh rối loạn phát triển giới tính không do TSTTBS theo phân loại Chicago 2006 [118]:*

Người bệnh có các triệu chứng: bất thường ở bộ phận sinh dục như dương vật nhỏ, lỗ đái thấp, ẩn tinh hoàn, không có dương vật, bìu chẻ đôi và giống với bộ phận sinh dục nữ. Người bệnh có dấu hiệu nữ hóa ở người có ngoại hình nam như vú phát triển, có kinh nguyệt. Người bệnh là nữ có hoặc dấu hiệu bất thường như vô kinh tiên phát, không có dấu hiệu dậy thì. Người bệnh có đặc điểm giới tính nam và nữ trên cùng một cơ thể.

Gia đình và/hoặc người bệnh nghi ngờ mắc TSTTBS và RLPTGT chấp thuận và ký phiếu tình nguyện tham gia nghiên cứu (phụ lục 1).

Tiêu chuẩn loại trừ:

Các đối tượng nghiên cứu không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Người bệnh rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid mắc phải như Cushing, Addison, hội chứng Conn, khối u tuyến thượng thận.

2.2. Trang bị, hoá chất và chất liệu nghiên cứu

2.2.1. Trang thiết bị

- Máy sắc ký khí – khối phổ: GC 7890A –MS 5975 của hãng Agilent. Cột sắc ký HP-5MS dài 30m, đường kính trong 0,25 mm, chiều dày film 0,25 μ m (Agilent)
- Máy hóa sinh tự động Beckman Coulter 2700 dùng định lượng creatinine niệu và đo nồng độ các chất điện giải đồ trong huyết tương như natri, kali, clo theo nguyên lý sử dụng điện cực chọn lọc.
- Máy miễn dịch tự động Cobas e601 của hãng Roche dùng trong định lượng cortisol, ACTH, testosterone theo nguyên lý phản ứng miễn dịch điện hóa phát quang ECLIA.
- Manifold để tách chiết ở pha lỏng của steroid niệu sau thủy phân.
- Máy lắc IKA vortex Genius 3.
- Máy trộn Roller-Mixer của DAIHAN Scientific.
- Máy Multivortex của THOMAS Scientific.
- Cân phân tích CPA3235 của SARTORIUS để cân hóa chất cần pha.
- Máy đo pH dung dịch ORION 3 STAR pH Benchop để đo pH dung dịch đệm acetat 2M dùng trong thủy phân steroid liên hợp trong nước tiểu.
- Tủ sấy Manheim của Đức dùng tạo dẫn xuất steroid ở 80⁰C và 110⁰C.
- Thiết bị làm khô sử dụng khí nitơ để loại bỏ methanol trong mẫu sau khi rửa giải loại Dry block heater của Ratek.

- Máy ly tâm, tủ lạnh 2-8°C, -20°C, pipette, tủ hút hóa chất.
- Các trang thiết bị cần thiết trong phòng xét nghiệm: găng tay, khẩu trang.



Hình 2.1. Hệ thống sắc ký khí – khối phổ Agilent

Đây là hình ảnh hệ thống GC/MS tại khoa Hóa sinh – Bệnh viện Nhi Trung ương là thiết bị quan trọng để thực hiện nghiên cứu này.

2.2.2. Hoá chất và vật tư tiêu hao

Hóa chất định lượng steroid niệu gồm:

- Chất chuẩn steroid niệu (*Standard steroid urine*) dạng đông khô của SKML (Hà Lan), chứa nồng độ xác định các steroid cần định lượng như An, Et, DHEA, 11keto An, 11OH An, 11OH Et, PD, PT, A'3, THE, THF, 5a-THF, α -cortolone, β -cortolone, α -cortol, β -cortol. Chuẩn steroid được làm mỗi khi định lượng steroid nhằm xây dựng đường chuẩn để tính nồng độ steroid niệu trong mẫu thử.

- Steroid tinh khiết (pure steroid của Steraloids/Sigma): các steroid tinh khiết > 99% được sử dụng để xác định thời gian lưu, mảnh ion đặc hiệu nhằm xác định tương ứng trong mẫu thử nghiên cứu các steroid niệu. Các steroid tinh khiết được sử dụng: An, Et, DHEA, 11-OH An, PD, PT, THE, THF, 5 α -THF.

- Chuẩn nội Androstanol (5α -ANDROSTAN- 3β -OL) của IsoSciences, dạng đông khô, lọ 100mg, (mã hóa chất 14283). Sau khi pha với methanol, chuẩn nội được cho vào mỗi mẫu thử một lượng như nhau để hiệu chỉnh sự mất mát trong quá trình xét nghiệm.
- Acid acetic bình dung tích 2,5L của Merck loại đậm đặc 100% dùng để pha dung dịch đệm acetat 2M (mã số hóa chất 1.00063.2500).
- HCl (hydrochloric acid fuming 37%) của hãng Merck- sản xuất tại Đức. Hóa chất dạng dung dịch, chai 1L, (mã hóa chất 1.00317.1000).
- Methanol dung tích 2,5L của hãng Merck sản xuất tại Đức, (mã hóa chất 10909809 742). Dùng để hoạt hóa cột Bond Elut, rửa giải và pha chuẩn nội, steroid tinh khiết.
- Enzym β -Glucuronidase/arylsulphatase của hãng KURA loại dung dịch 10mL hoặc 25mL để thủy phân steroid liên hợp.
- Nitrogen có độ tinh khiết rất cao, mã số UN 1066, nồng độ $\geq 99,999\%$ dùng làm khô sản phẩm steroid sau tách chiết.
- Helium có độ tinh khiết cao, mã số UN 1046 dùng để sắc ký khí.
- Methoxyamine hydrochloride độ tinh khiết 98%, lọ 5G dạng bột của hãng Sigma Aldrich, (mã 101397955) dùng để tạo dẫn xuất với steroid.
- Pyridine dạng dung dịch chai 1L của hãng Sigma Aldrich có độ tinh khiết $\geq 99,5\%$ (mã hóa chất 33553), sử dụng để pha methoxyamine.
- Sodium acetate anhydrous dạng bột, loại 1000G của Merck dùng để pha đệm acetat 2M trong quá trình thủy phân steroid liên hợp.
- Sodium -L-ascorbate (vitamin C), (mã hóa chất A4034), lọ 100G dạng bột của hãng Sigma Aldrich có độ tinh sạch $\geq 98\%$ nhằm ổn định các steroid tự do.
- Iso-octan dạng dung dịch 1L của hãng Sigma Aldrich dùng để tách chiết steroid sau khi đã thủy phân và tạo dẫn xuất.
- TMSI (n-Trimethylsilylimidazole) dạng dung dịch, lọ 25mL của SUPELCO, sản xuất tại Hoa Kỳ, (mã hóa chất 33068U).

- Nước cất tinh khiết dành cho sắc ký: dung tích 2,5L của hãng Merck sản xuất tại Đức dùng để pha hóa chất, chất chuẩn...

Vật tư tiêu hao bao gồm: Lọ thủy tinh 2 mL có nắp, ống nghiệm thủy tinh chịu nhiệt loại 7mL và 10mL của Kimax hoặc Pirex.

Cột Bond-Elut C18 dùng để tách chiết, tinh sạch các steroid tự do.

Bảng 2.1: Các sản phẩm steroid niệu được định lượng

<i>Steroid niệu</i>	<i>Thời gian lưu (phút)</i>	<i>Ion đích (m/z)</i>	<i>Ion định lượng (m/z)</i>
Chuẩn nội	13,3	243	258
An	16,9	270	360
Et	17,1	270	360
DHEA	18,2	268	358
11 keto An	18,7	300	315
11-OH An	19,6	448	358
11-OH Et	19,8	448	358
PD	20,4	269	284
PT	20,8	435	255
A'3	21,4	432	329
THE	23,4	578	488
THF	23,9	562	472
5 α -THF	24,1	562	472
α -Cortolone	24,4	449	359
β -Cortol	24,5	343	243
β -Cortolone	24,8	449	359
α -Cortol	25,1	343	243
THS*	21,8	474	564

THS là steroid có trong mẫu steroid tinh khiết được sử dụng để bán định lượng THS trong mẫu thử do mẫu chuẩn không có nồng độ cho THS.

2.2.3. Chất liệu nghiên cứu

- Mẫu nước tiểu ngẫu nhiên của trẻ khỏe mạnh và người bệnh nghi mắc TSTTBS, RLPTGT. Yêu cầu của mẫu nước tiểu:

- ✓ Không sử dụng chất bảo quản.
- ✓ Thể tích cần thiết > 3mL nước tiểu.
- ✓ Bảo quản: mẫu nước tiểu sau khi lấy được bảo quản tạm thời ở 2 - 8°C tối đa được 2 tuần. Bảo quản ở -20°C đến khi phân tích (tối đa được 6 tháng).
- ✓ Thời gian thu thập mẫu: 10/2015-7/2018.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Nghiên cứu mô tả, cắt ngang.

2.3.1. Thẩm định kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS

2.3.1.1. Quy trình định lượng steroid niệu

Quy trình chuẩn bị mẫu được thực hiện hoàn toàn thủ công, cải tiến dựa trên kỹ thuật của Honour JW [14]. Tổng thời gian chuẩn bị mẫu khoảng 28 giờ trước khi được bơm tự động vào máy GC/MS.

A. Chuẩn bị hoá chất, thuốc thử:

✓ Pha dung dịch chuẩn steroid niệu từ dạng đông khô: thêm 15 mL nước cất vào lọ chuẩn, để ổn định 15 phút ở nhiệt độ phòng, trộn đều và chia nhỏ ra các eppendorf mỗi ống 2mL, bảo quản ở -20°C.

✓ Chuẩn bị hỗn hợp steroid tinh khiết:

Cân khoảng 8 mg mỗi loại steroid tinh khiết, ghi lại chính xác khối lượng được cân và hoà tan trong bình định mức với 100 mL methanol, thao tác trong tủ hút hóa chất. Để ở bể ấm 37°C cho tan hoàn toàn, bảo quản ở -20°C.

✓ Chuẩn nội Androstanol: cân khoảng 10 mg chuẩn nội, hoà tan trong 100 mL methanol, thao tác thực hiện trong tủ hút hóa chất, bảo quản ở 4°C.

✓ Vật liệu kiểm tra chất lượng (QC: Quality control): do không có mẫu nội kiểm thương mại trên thị trường nên chúng tôi sử dụng mẫu nội kiểm tự chuẩn bị bằng cách thu thập mẫu nước tiểu của người khỏe mạnh làm mẫu trộn bình thường và mẫu nước tiểu người bệnh mắc TSTTBS đã chẩn đoán xác định làm mẫu trộn bệnh lý. Chia nhỏ mẫu trộn bình thường và mẫu trộn bệnh lý mỗi ống 3 mL và bảo quản ở -20°C .

✓ Vật liệu ngoại kiểm tra chất lượng (EQA) của SKML (Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek - Nijmegen, Netherlands) trong chương trình ngoại kiểm steroid niệu quốc tế UCLH Urine Steroid Profile External Quality Assesment Scheme tổ chức bởi University College London Hospitals (London-United Kingdom), có sự tham gia của 28 phòng xét nghiệm trên thế giới. Mỗi chu kỳ ngoại kiểm có 12 mẫu dạng đông khô: thực hiện 1 mẫu/ 1 tháng.

✓ Đệm acetat 2M; pH 5,0 - 5,2 pha từ dung dịch acetat 2M và acid acetic 2M với thể tích nhất định. Đo pH và điều chỉnh pH đạt yêu cầu để tối ưu hoạt tính enzym thủy phân steroid liên hợp.

✓ Methoxyamine hydrochloride trong pyridine: Cân 100 mg methoxyamine hydrochloride và hoà tan trong 3 mL pyridine để tạo dung dịch 3%. Thao tác kỹ thuật cần được thực hiện trong tủ hút hóa chất.

✓ Ascorbate: pha 10 mg/1mL nước cất sử dụng ngay mỗi lần phân tích.

B. Các bước chuẩn bị mẫu: thủy phân, tách chiết steroid niệu và tạo dẫn xuất.

Cách chuẩn bị mẫu nội kiểm và ngoại kiểm, chất chuẩn, mẫu bệnh: cho vào mỗi ống thủy tinh loại 10mL đệm acetat, mẫu bệnh phẩm, chuẩn nội, enzym glucuronidase/ sulphatase, ascorbate đã pha như sau:

✓ Thủy phân steroid liên hợp: Trộn đều các mẫu để thủy phân các steroid liên hợp bằng enzym β -glucuronidase/ arylsulfatase. Ủ mẫu ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Sau khi thủy phân, ly tâm mẫu 4000 rpm x 5 phút.

Bảng 2.2: Cách thức tiến hành định lượng steroid niệu.

Ống	Loại mẫu	Thể tích mẫu	Chuẩn nội	Đệm acetat	Enzym	Ascorbate
1	Mẫu chuẩn	2 mL	100 μ L	3 mL	100 μ L	100 μ L
2	Steroid tinh khiết	0,2 mL	100 μ L	3 mL	100 μ L	100 μ L
3	Mẫu trộn bình thường	2 mL	100 μ L	3 mL	100 μ L	100 μ L
4	Mẫu trộn bệnh lý	2 mL	100 μ L	3 mL	100 μ L	100 μ L
5	Ngoại kiểm	2 mL	100 μ L	3 mL	100 μ L	100 μ L
≥ 6	Mẫu bệnh	2 mL	100 μ L	3 mL	100 μ L	100 μ L

- ✓ Tách chiết steroid tự do bằng cột Blond – Elut C18: Đánh số các cột, đặt lên manifold, cho 3mL methanol vào mỗi cột để hoạt hóa cột. Khi chảy hết methanol cần cho 5ml nước cất tinh khiết để rửa sạch methanol. Cho bệnh phẩm đã thủy phân steroid lên cột, chờ chảy xong. Cho 3mL nước cất vào mỗi cột để làm sạch. Cho 3mL methanol vào mỗi cột để tách lấy steroid tự do.
- ✓ Làm khô dung dịch methanol chứa steroid bằng thiết bị làm khô sử dụng khí nitơ ở 70°C.
- ✓ Tạo dẫn xuất với methoxyamin: cho 100 μ L methoxyamin/pyridin 3% đã pha, vortex và ủ ở 80°C trong 1,5 giờ.
- ✓ Tạo dẫn xuất silyl: cho 100 μ L TMSI vortex rồi ủ ở 110°C trong 3,5 giờ.

- ✓ Tách chiết bằng iso – octan thu được mẫu để phân tích trên GC/MS: cho 400 μ L HCl 1M và 600 μ L iso-octan, vortex 10 phút, để lắng tự nhiên rồi hút dịch nổi vào glass-insert là mẫu để phân tích trên hệ thống GC/MS.

C. Phân tích steroid bằng hệ thống GC/MS sau chuẩn bị mẫu

- Sử dụng hệ thống GC 7890A –MS 5975 (Agilent), cột sắc ký HP-5MS, bơm bằng bơm tự động Agilent 7693. Chương trình nhiệt độ lò cột từ 180 đến 300 °C trong 30 phút. Tốc độ khí heli qua cột là 1 (mL/phút). Các steroid rửa giải được phát hiện bằng phổ khối theo phương pháp SIM (*selected ion monitoring*) sử dụng mỗi ion đặc hiệu cho một steroid cần phát hiện.

- Xây dựng đường chuẩn: phân tích mẫu chuẩn có nồng độ 16 sản phẩm steroid đã biết song song với mẫu người bệnh và nội kiểm, ngoại kiểm. Đường chuẩn được thiết lập cho mỗi chất phân tích dựa vào nồng độ mỗi steroid đã biết trong mẫu chuẩn. Sau khi đã thiết lập được đường chuẩn cho mỗi steroid cần đo lường, sử dụng phần mềm ChemStation để xác định nồng độ steroid trong mẫu thử, mẫu nội kiểm, mẫu ngoại kiểm.

Mẫu steroid tinh khiết đã biết được thực hiện như mẫu thông thường để làm căn cứ xác định thời gian lưu của các steroid trong mẫu chuẩn, mẫu bệnh.

2.3.1.2. **Thẩm định phương pháp định lượng steroid niệu bằng GC/MS**

➤ *Thực nghiệm xác định giới hạn định lượng (limit of quantitation -LoQ):* Sử dụng dung dịch chuẩn pha loãng 5 lần ở 5 nồng độ khác nhau để xác định giới hạn nhỏ nhất của mỗi steroid có thể phát hiện được. Mỗi dung dịch chuẩn pha loãng được đo lặp lại 4 lần trong một mẻ chạy để tính toán giá trị SD và CV. Giới hạn định lượng là nồng độ chất chuẩn ở mức thấp nhất được phát hiện mà $CV \leq 20\%$ giữa các lần phân tích.

➤ *Thực nghiệm đánh giá độ lặp (precision):*

- Độ lặp lại được đánh giá bằng cách đo lặp lại hai mẫu nước tiểu trộn bình thường và mẫu trộn bệnh lý 20 lần trong cùng một lần phân tích trong một ngày.

- Độ tái lập được đánh giá bằng cách phân tích hai mẫu nước tiểu bình thường và bệnh lý > 20 lần trong > 20 mẻ phân tích khác nhau.

➤ *Thực nghiệm đánh giá độ chính xác (accuracy)*: các vật liệu ngoại kiểm chương trình ngoại kiểm steroid (SKML) được tiến hành phân tích. Kết quả của mỗi chất phân tích thu được được so sánh với trung vị của ngoại kiểm, tính phương trình và hệ số tương quan, đánh giá sự tương đồng.

➤ *Thực nghiệm xác định độ thu hồi (recovery experiment)*: mẫu 1 thêm 0,2 mL chuẩn steroid vào 1,8 mL nước tiểu trộn bình thường. Mẫu 2 thêm 0,2 mL nước cất vào 1,8 mL mẫu nước tiểu trộn bình thường. Phân tích hai mẫu trên, mỗi mẫu được đo lặp lại 3 lần và tính độ thu hồi như sau:

Nồng độ chuẩn thêm vào = Nồng độ chuẩn x thể tích chuẩn thêm vào (mL)

Nồng độ thu hồi = Nồng độ mẫu thêm chuẩn – Nồng độ mẫu thêm nước cất

Thu hồi (%) = Nồng độ thu hồi / Nồng độ chuẩn thêm vào x 100

2.3.2. Thiết lập khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ em

- Thu thập mẫu nước tiểu của 269 trẻ bình thường, thông tin được thu thập theo phiếu điều tra dành cho trẻ khỏe mạnh (phụ lục 2a).

- Định lượng steroid theo quy trình chuẩn đã xây dựng đồng thời với định lượng nồng độ creatinin niệu trên máy Beckman Coulter 2700. Nồng độ các steroid niệu được tính bằng đơn vị $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine.

- Xử lý số liệu lạc và đánh giá tính chuẩn của tập hợp số liệu.

- So sánh sự khác biệt nồng độ steroid theo độ tuổi của trẻ em.

- So sánh sự khác biệt nồng độ steroid giữa nam và nữ trong mỗi độ tuổi, nếu không có sự khác biệt giữa nam và nữ thì khoảng tham chiếu được thiết lập chung cho cả nam và nữ. Nếu có sự khác biệt nồng độ steroid giữa nam và nữ thì khoảng tham chiếu được thiết lập riêng cho nam và riêng cho nữ:

- Phương pháp tham số: giả định các dữ liệu tham chiếu tuân theo quy luật phân bố chuẩn, tính trung bình và SD, giới hạn tham chiếu là $\bar{X} \pm 2SD$

- Phương pháp phi tham số: sắp xếp dữ liệu theo hướng tăng dần của giá trị, lựa chọn giá trị thấp và giá trị cao của khoảng tham chiếu từ danh sách các giá trị tham chiếu trên sao cho giá trị tham chiếu thấp ứng với bách phân vị 2,5 (2.5% percentile) và giá trị tham chiếu cao ứng với bách phân vị 97,5 (97.5% percentile) của khoảng tham chiếu [25].

$$x_{0,025} = 0.025 (n + 1)$$

$$x_{0,975} = 0.975 (n + 1)$$

Trong đó

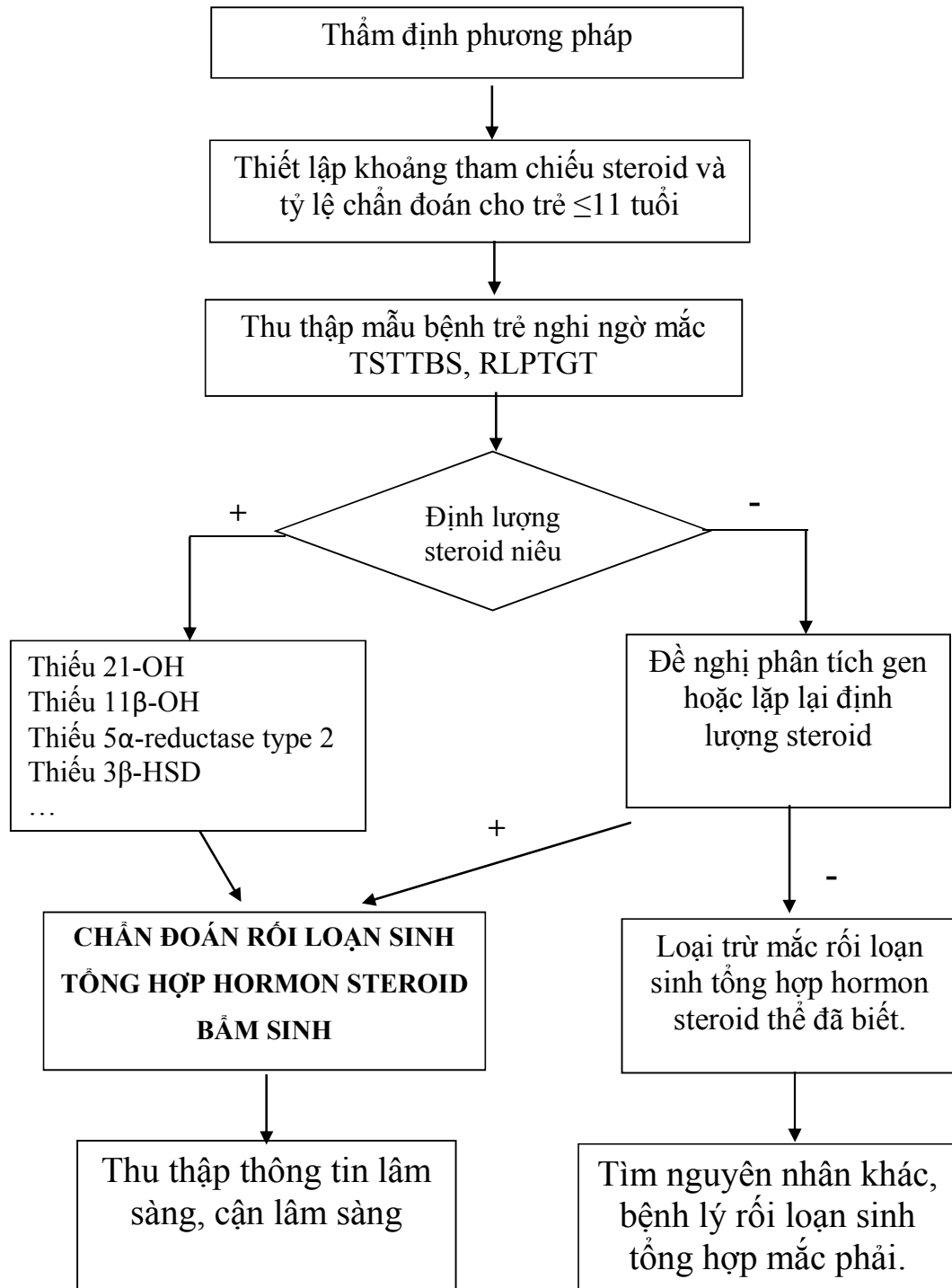
- $x_{0,025}$ là giá trị tham chiếu thấp ứng với bách phân vị 2,5.
- $x_{0,975}$ là giá trị tham chiếu cao ứng với bách phân vị 97,5.
- n là số lượng mẫu thiết lập khoảng tham chiếu.
- Tính 8 tỷ lệ chẩn đoán cho từng mẫu.
- Thiết lập khoảng tham chiếu cho 8 tỷ lệ chẩn đoán tương tự như với nồng độ các steroid niệu.

2.3.3. Chẩn đoán rối loạn tổng hợp steroid ở trẻ em.

- Thu thập mẫu nước tiểu ngẫu nhiên của người bệnh có triệu chứng của TSTTBS, RLPTGT, thông tin được thu thập theo phiếu điều tra dành cho người bệnh nghi mắc TSTTBS, RLPTGT trong phụ lục 2b.

- Định lượng steroid niệu của trẻ nghi ngờ mắc bệnh theo quy trình chuẩn.
- Định lượng creatinine trong nước tiểu.

Phân tích kết quả định lượng steroid niệu: mẫu hình sắc ký đồ đặc trưng với các đỉnh bất thường đặc hiệu cho từng bệnh TSTTBS, RLPTGT. Nồng độ các steroid ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) và tỷ lệ chẩn đoán thích hợp giữa các steroid niệu được so sánh với khoảng tham chiếu để chẩn đoán xác định. Trường hợp thiếu 21-OH, 11 β -OH, 3 β -HSD II, 5 α -reductase type 2 phát hiện bằng định lượng steroid niệu được thu thập thông tin lâm sàng, cận lâm sàng nếu có: (natri, kali, clo, 17-OHP, testosterone, cortisol, ACTH, phân tích gen).



Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu

Tiêu chuẩn chẩn đoán bao gồm tiêu chuẩn định tính (xuất hiện các đỉnh bất thường), tiêu chuẩn định lượng và tiêu chuẩn loại trừ.

Chẩn đoán **thiếu 21-OH** được xác định khi có các đặc trưng sau:

- ✓ Có sự xuất hiện của đỉnh 17OHPN, PTL trên sắc ký đồ (định tính).
- ✓ Nồng độ PT cao hơn khoảng tham chiếu.
- ✓ Tỷ lệ PT/ (THE +THF +5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu.
- ✓ Tỷ lệ THS/ (THE +THF +5 α -THF) trong giới hạn khoảng tham chiếu.

Chẩn đoán **thiếu 11 β -OH** được xác định khi có các đặc trưng sau:

- ✓ Có sự xuất hiện đỉnh THS trên sắc ký đồ (định tính)
- ✓ Nồng độ THS cao hơn khoảng tham chiếu.
- ✓ Tỷ lệ THS/ (THE +THF +5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu.

Chẩn đoán **thiếu 3 β -HSD II** khi có các đặc trưng sau:

- ✓ Không có dấu hiệu thiếu 21-OH hoặc 11 β -OH.
- ✓ Nồng độ DHEA cao hơn khoảng tham chiếu.
- ✓ Tỷ lệ DHEA/ (THE +THF +5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu.

Chẩn đoán **thiếu 5 α -reductase type 2** khi có các đặc trưng sau:

- ✓ Là người bệnh nam, có bộ nhiễm sắc thể 46,XY, có triệu chứng RLPTGT (dương vật nhỏ, lỗ đái thấp).
- ✓ Tỷ lệ THF/5 α -THF cao hoặc tỷ lệ 5 α -THF/THF thấp hơn khoảng tham chiếu tương ứng với tuổi và giới người bệnh.
- ✓ Tỷ lệ Et/An cao hoặc An/Et thấp hơn khoảng tham chiếu (nếu có).

Một số tỷ lệ thường dùng trong chẩn đoán bệnh lý rối loạn tổng hợp hormon steroid [8],[11].

Bảng 2.3: Một số tỷ lệ chẩn đoán thường dùng

<i>Số TT</i>	<i>Tỷ lệ chẩn đoán</i>	<i>Ý nghĩa chẩn đoán</i>
1	PT/ (THE + THF + 5 α -THF)	Thiếu 21-OH
2	THS/(THE + THF + 5 α -THF)	Thiếu 11 β -OH
3	5 α -THF/THF	Thiếu 5 α -reductase type 2
4	THF/5 α -THF	Thiếu 5 α -reductase type 2
5	(THF + 5 α -THF)/THE	AME
6	DHEA/(THE + THF + 5 α -THF)	Thiếu 3 β -HSD II
7	An/Et	Thiếu 5 α -reductase type 2
8	Et/An	Thiếu 5 α -reductase type 2

2.4. Phân tích và xử lý số liệu

- Mục tiêu thẩm định phương pháp: tính giá trị trung bình (\bar{X}), độ lệch chuẩn (SD), hệ số biến thiên (CV) để đánh giá độ chụm của kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS bằng phần mềm Excel. Đánh giá sự tương quan, tương đồng giữa kết quả ngoại kiểm của phòng xét nghiệm với giá trị trung vị của các phòng xét nghiệm tham gia ngoại kiểm bằng phần mềm đánh giá phương pháp Method Validator.

- Mục tiêu thiết lập giá trị tham chiếu steroid niệu cho trẻ sơ sinh bằng GC/MS: sử dụng phần mềm IBM SPSS 22.0 để đánh giá phân bố của các dữ liệu nồng độ steroid niệu thu được. Kết quả sự phân bố các steroid niệu thu được là không chuẩn (không theo quy luật Gaussian) nên áp dụng phương pháp thống kê phi tham số (nonparametric) để thiết lập khoảng tham chiếu cho mỗi chất phân tích. Sau khi loại bỏ các giá trị lạc, thiết lập khoảng tham chiếu dựa trên giá trị thấp nhất, cao nhất của khoảng 95% phân bố ở giữa từ phân vị thứ 2,5 đến 97,5.

- Mục tiêu chẩn đoán rối loạn sinh tổng hợp steroid ở trẻ em: dựa vào khoảng tham chiếu đã xây dựng cho nhóm chứng, phát hiện các người bệnh có đủ tiêu chuẩn chẩn đoán TSTTBS và RLPTGT tương ứng để chẩn đoán.

- Giá trị $p < 0,05$ được sử dụng để xác định sự khác biệt khi so sánh trung bình, trung vị.

- So sánh nồng độ steroid niệu giữa nam và nữ, giữa nhóm bệnh và nhóm chứng bằng kiểm định Mann-Whitney dành cho các biến độc lập phân bố không theo quy luật chuẩn.

- So sánh nồng độ steroid niệu và tỷ lệ chẩn đoán giữa 4 nhóm tuổi, các nhóm chẩn đoán khác nhau bằng kiểm định Kruskal-Wallis.

- Phân tích đường cong ROC cho các nồng độ steroid và tỷ lệ chẩn đoán quan trọng, xác định điểm cắt tối ưu, độ nhạy, độ đặc hiệu chẩn đoán và giá trị chẩn đoán âm tính, giá trị chẩn đoán dương tính. Trong đó diện tích dưới đường cong AUC có giá trị chẩn đoán như sau:

+ AUC từ 0,5 – 0,59: xét nghiệm không có giá trị chẩn đoán

+ AUC từ 0,6 – 0,69: xét nghiệm có ít giá trị chẩn đoán

+ AUC từ 0,7 – 0,79: xét nghiệm có giá trị chẩn đoán khá

+ AUC từ 0,8 – 0,89: xét nghiệm có giá trị chẩn đoán tốt

+ AUC từ 0,9 – 1,00: xét nghiệm có giá trị chẩn đoán rất tốt

2.5. Đạo đức y học

Đề tài được hội đồng đạo đức y sinh học của trường Đại học Y Hà Nội thông qua theo quyết định số 187/HĐĐĐĐHYHN ngày 20 tháng 02 năm 2016. Các thông tin liên quan đến đối tượng nghiên cứu được bảo mật và không sử dụng cho mục đích khác tuân theo quy định về đạo đức y học trong nghiên cứu y sinh học. Người bệnh và trẻ khỏe mạnh có đủ nhận thức đồng ý tham gia đề tài nghiên cứu, với trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ được gia đình/ người giám hộ của trẻ đồng ý tham gia nghiên cứu.

Chương 3

KẾT QUẢ

3.1. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng steroid niệu

3.1.1. Giới hạn định lượng và độ thu hồi

Bảng 3.1: Giới hạn định lượng và độ thu hồi của các steroid niệu

<i>Steroid niệu</i>	<i>Giới hạn định lượng</i>		<i>Độ thu hồi (%)</i>
	<i>Giới hạn định lượng ($\mu\text{mol/L}$)</i>	<i>CV (%)</i>	
An	0,11	13,18	102,5
Et	0,05	10,69	114,7
DHEA	0,10	17,84	113,3
11 keto An	0,12	8,36	111,1
11-OH An	0,07	19,3	112,0
11-OH Et	0,09	10,48	113,6
PD	0,07	14,64	100,0
PT	0,07	16,86	101,5
A'3	0,21	9,82	91,4
THE	0,16	11,28	112,7
THF	0,11	18,43	110,2
5 α -THF	0,11	18,07	106,3
α -Cortolone	0,09	8,32	91,3
β -Cortol	0,11	15,16	91,8
β -Cortolone	0,06	10,9	99,4
α -Cortol	0,27	13,09	90,9

Giới hạn định lượng của 14/16 steroid niệu từ 0,05 đến 0,16 ($\mu\text{mol/L}$), riêng α -Cortol và A³ có giới hạn định lượng lần lượt là 0,27 và 0,21($\mu\text{mol/L}$) cao hơn các sản phẩm khác, đây là hai sản phẩm ít có giá trị chẩn đoán.

Độ thu hồi các sản phẩm chuyển hóa steroid niệu đạt từ 90% đến 115%, trung bình là $104,1 \pm 9,25\%$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

3.1.2. Độ lặp và độ tái lặp

Bảng 3.2: Độ lặp lại của các steroid niệu

<i>Steroid niệu</i>	<i>Mẫu trộn bình thường</i>			<i>Mẫu trộn bệnh lý</i>		
	\bar{x} ($\mu\text{mol/L}$)	SD ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)	\bar{x} ($\mu\text{mol/L}$)	SD ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)
An	1,25	0,096	7,72	18,44	1,695	9,20
Et	1,50	0,098	6,53	12,63	1,091	8,64
PD	2,31	0,06	2,72	2,61	0,093	3,54
PT	1,49	0,015	1,01	86,87	0,677	0,78
THE	7,47	0,314	4,20	22,33	1,362	6,10
THF	2,87	0,107	3,72	6,15	0,355	5,80
5 α -THF	3,03	0,132	4,34	8,02	0,459	5,70
α -Cortolone	3,13	0,051	1,62	4,42	0,090	2,04
β -Cortol	1,22	0,053	2,82	1,23	0,041	3,33
β -Cortolone	2,13	0,045	2,11	3,16	0,075	2,36
α -Cortol	0,49	0,030	6,12	0,80	0,031	3,95

Độ lặp lại của các steroid niệu với mẫu trộn bình thường có CV từ 1,01 đến 7,72% và mẫu trộn bệnh lý có CV từ 0,78 đến 9,72%.

Giá trị trung bình của CV ở mẫu trộn bình thường là $4,0 \pm 2,2$ (%) và mẫu trộn bệnh lý là $4,7 \pm 2,7$ (%) ($\bar{X} \pm SD$).

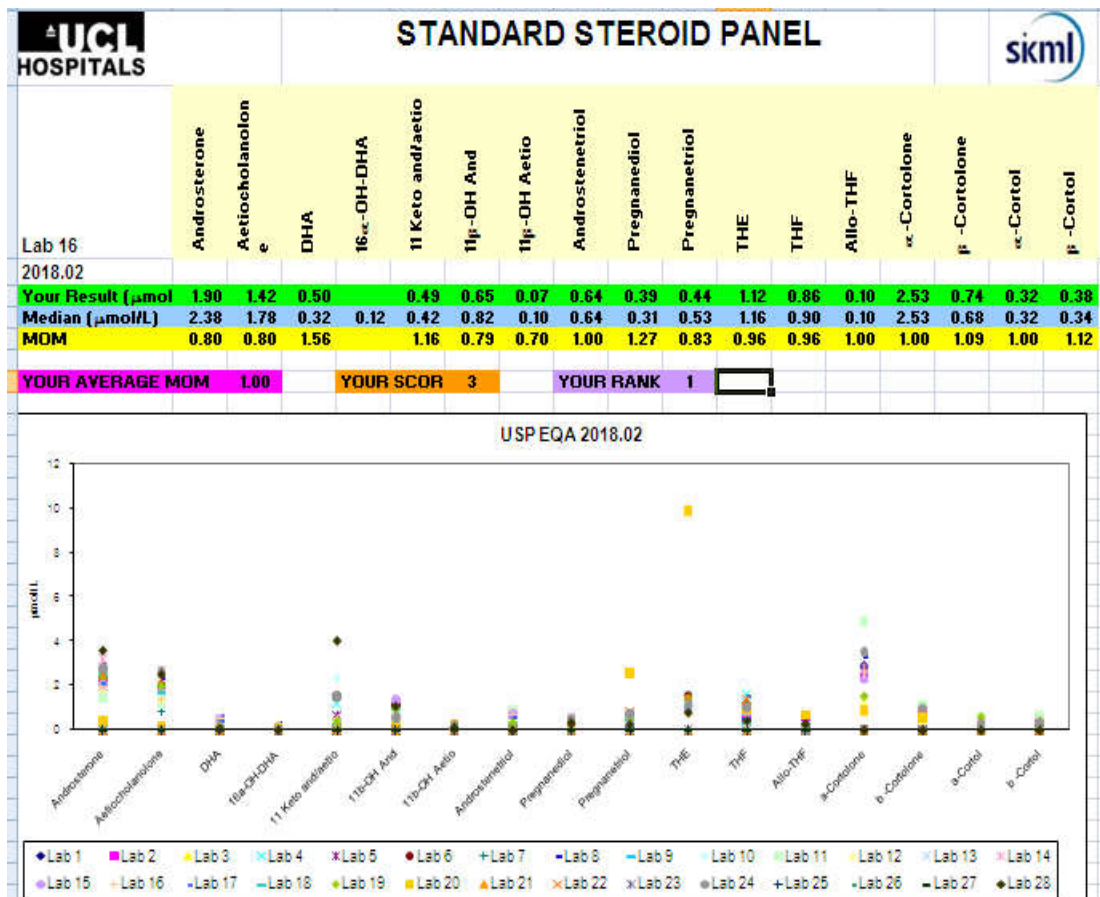
Bảng 3.3: Độ tái lập của các steroid niệu

<i>Steroid niệu</i>	Mẫu trộn bình thường			Mẫu trộn bệnh lý		
	\bar{X} ($\mu\text{mol/L}$)	SD ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)	\bar{X} ($\mu\text{mol/L}$)	SD ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)
An	1,23	0,15	12,55	15,00	2,44	16,26
Et	1,48	0,18	11,87	10,14	1,61	15,91
PD	2,42	0,34	14,04	2,50	0,35	14,13
PT	1,72	0,23	13,61	89,33	11,17	12,51
THE	8,08	1,04	12,9	22,96	3,68	16,01
THF	3,14	0,32	10,16	6,34	0,87	13,7
5 α -THF	3,46	0,48	13,81	8,48	1,23	14,53
α -Cortolone	3,36	0,40	11,83	5,19	0,78	15,7
β -Cortol	1,39	0,20	14,53	1,47	0,22	15,26
β -Cortolone	2,37	0,30	12,65	3,56	0,47	13,14
α -Cortol	0,58	0,08	13,37	0,85	0,14	16,95

Độ tái lập của các steroid niệu có CV 10,16 - 14,53(%) ở mẫu trộn bình thường và 12,51 – 16,95(%) ở mẫu trộn bệnh lý. Giá trị trung bình \pm SD của CV ở mẫu bình thường là $12,85 \pm 1,24$ (%) và mẫu bệnh lý là $14,86 \pm 1,4$ (%) ($\bar{X} \pm SD$).

3.1.3. Kết quả ngoại kiểm steroid niệu

Chương trình ngoại kiểm steroid niệu bằng GC/MS có sự tham gia của 28 phòng xét nghiệm. Một trong số các kết quả chúng tôi nhận được (mẫu số 2 năm 2018) như sau:



Biểu đồ 3.1: Kết quả ngoại kiểm

Phòng xét nghiệm Hóa sinh – Bệnh viện Nhi Trung ương đăng ký tham gia ngoại kiểm SKML cho 16 steroid niệu, riêng THS không tham gia do chương trình không thực hiện định lượng nồng độ cho steroid này. Giá trị của phòng xét nghiệm chia cho giá trị trung vị để được giá trị MOM, trung bình của MOM được sử dụng để tính điểm (score) cao nhất đạt 3 điểm, thấp nhất là 0 điểm và xếp thứ hạng (rank) từ 1 đến 28. Biểu đồ 3.1 là kết quả ngoại kiểm

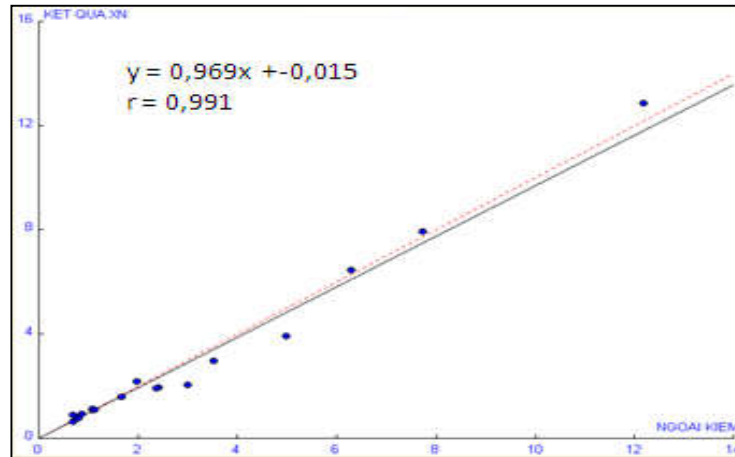
tháng 2 năm 2018 của chúng tôi đạt 3 điểm và xếp thứ nhất trong số 28 phòng xét nghiệm tham gia ngoại kiểm.

Bảng 3.4. Mối tương quan kết quả phòng xét nghiệm với ngoại kiểm

Steroid niệu	Hệ số a	Hệ số b	Phương trình $y = a.x + b$	Hệ số r
An	0,969	-0,015	$y=0,969x-0,015$	0,991
Et	1,014	-0,024	$y=1,014x-0,024$	0,992
DHEA	1,250	0,0	$y=1,25x + 0$	0,983
11Keto An	1,106	-0,065	$y=1,106x-0,065$	0,991
11-OH An	1,042	-0,068	$y=1,0x-0,068$	0,996
11-OH Et	0,611	0,039	$y=0,611x+0,039$	0,981
PD	1,080	0,021	$y=1,08x+0,021$	0,988
PT	0,997	0,039	$y=0,997x+0,039$	0,999
A'3	1,149	-0,042	$y=1,149x-0,042$	0,995
THE	1,250	-0,891	$y=1,25x-0,891$	0,990
THF	1,113	-0,406	$y=1,113x-0,406$	0,995
5 α -THF	1,148	-0,037	$y=1,148x-0,037$	0,970
α -Cortolone	1,124	-0,211	$y=1,124x-0,211$	0,981
β -Cortolone	1,113	-0,082	$y=1,113x-0,082$	0,992
α -Cortol	1,00	-0,01	$y=1,0x-0,01$	0,997
β -Cortol	1,013	-0,006	$y=1,013x-0,006$	0,994

Từ kết quả của phòng xét nghiệm và kết quả các phòng xét nghiệm khác so sánh kết quả với giá trị trung vị của EQA, thiết lập phương trình tương quan $y = a.x + b$. Từ kết quả 17 mẫu ngoại kiểm, tính hệ số tương quan và phương trình tương quan cho thấy phần lớn các steroid niệu tương quan chặt chẽ với kết quả EQA với hệ số tương quan 0,970 - 0,999. Phương trình tương quan dạng $y = a.x + b$ với y là kết quả phòng xét nghiệm chúng tôi, x là kết quả ngoại kiểm. Hệ số góc a đều xấp xỉ giá trị 1,0 và giao cắt trục tung tại điểm b có giá trị xấp xỉ 0 nên các đường thẳng tuyến tính gần như đều đi qua gốc tọa độ.

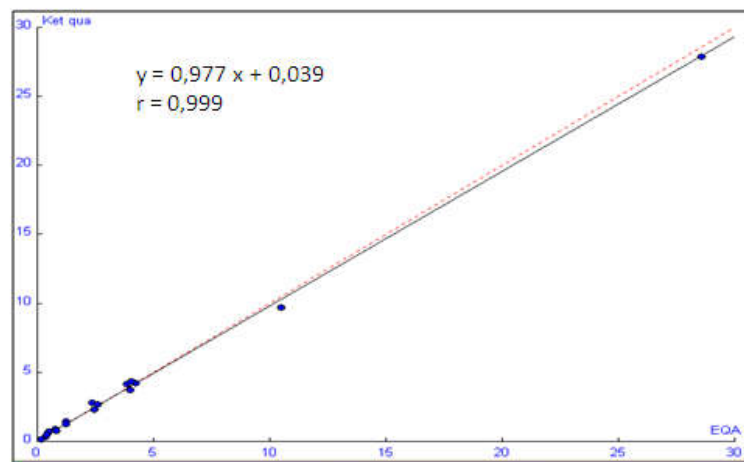
Riêng THE và DHEA cao hơn giá trị ngoại kiểm với hệ số a là 1,25 và 11-OH Et thấp hơn giá trị ngoại kiểm với hệ số a là 0,611. Tuy nhiên khi so sánh sự tương đồng giữa kết quả của phòng xét nghiệm với ngoại kiểm, phần lớn kết quả nằm trong khoảng $\pm 2SD$.



Biểu đồ 3.2. Tương quan kết quả An

An: Androsterone

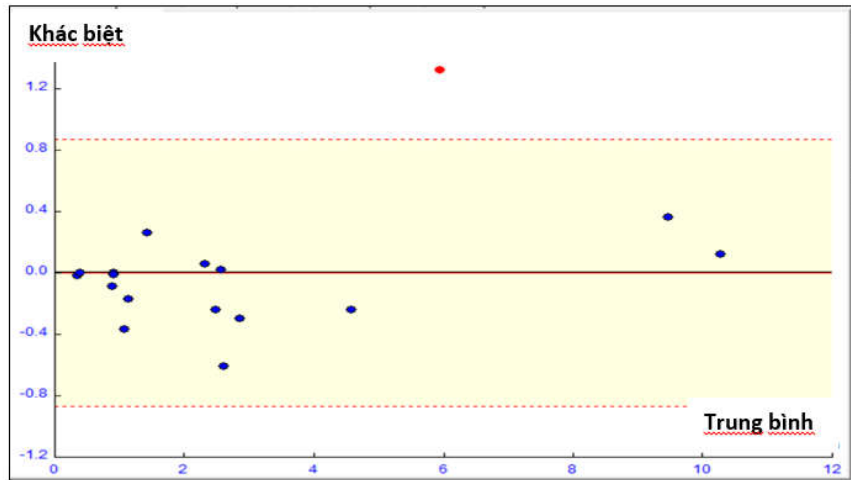
Hệ số tương quan $r = 0,991$; hệ số góc $a = 0,969$; giao cắt trục tung tại điểm có giá trị $b = - 0,015$.



Biểu đồ 3.3. Tương quan kết quả PT

PT: Pregnanetriol

Hệ số tương quan $r = 0,999$; hệ số $a = 0,977$; giao cắt trục tung tại $b = 0,039$.



Biểu đồ 3.4. Sự tương đồng kết quả Et

Kết quả Et tương đồng với trung vị của các phòng xét nghiệm tham gia ngoại kiểm trừ điểm đánh dấu màu đỏ, sự khác biệt chỉ là 0,005 $\mu\text{mol/L}$ (0,95 confid interval: -0,206 tới 0,217).



Biểu đồ 3.5. Sự tương đồng kết quả DHEA

Phần lớn giá trị của DHEA tương đồng với giá trị trung vị của kết quả ngoại kiểm trừ điểm màu đỏ. Sự khác biệt của chúng tôi với kết quả trung vị từ các phòng xét nghiệm khác là -0,032 (0,95 confid interval: -0,197 đến 0,133).

3.2. Khoảng tham chiếu các steroid niệu ở trẻ em

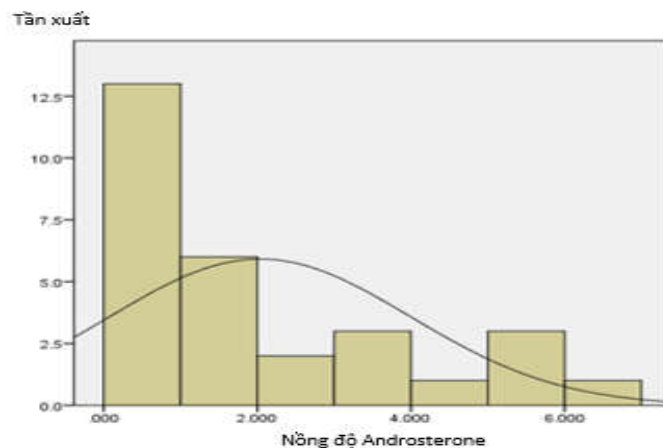
Bảng 3.5. Phân bố độ tuổi và giới tính nhóm chứng

Tuổi	Nam n (%)	Nữ n (%)	Tổng số n (%)	p
1-28 ngày	34 (12,6%)	30 (11,2%)	64 (23,8%)	0,617
1 tháng- 2 tuổi	31 (11,5%)	30 (11,2%)	61 (22,7%)	0,898
2-< 8 tuổi	43 (16,0%)	31 (11,5%)	74 (27,5%)	0,163
8-<11 tuổi	29 (10,8%)	41 (15,2%)	70 (26,0%)	0,151
Tổng số	137 (50,9%)	132 (40,1%)	269 (100%)	0,243

Không có sự khác biệt về số lượng trẻ nam và nữ trong từng nhóm tuổi cũng như giữa tổng số nam và tổng số nữ ($p > 0,05$).

3.2.1. Sự phân bố các steroid niệu

Toàn bộ 16 sản phẩm chuyển hóa của steroid niệu đều không tuân theo quy luật chuẩn (Gaussian). Thuật toán thống kê, xử lý số liệu và so sánh dựa vào giá trị trung vị, giá trị thấp nhất, giá trị cao nhất. Khoảng tham chiếu gồm 95% giá trị nằm ở giữa được lấy giá trị ở điểm cắt phân vị thứ 2,5 và 97,5 cho mỗi kết quả định lượng steroid niệu.



Biểu đồ 3.6. Sự phân bố nồng độ An ở trẻ nam 8 - ≤11 tuổi

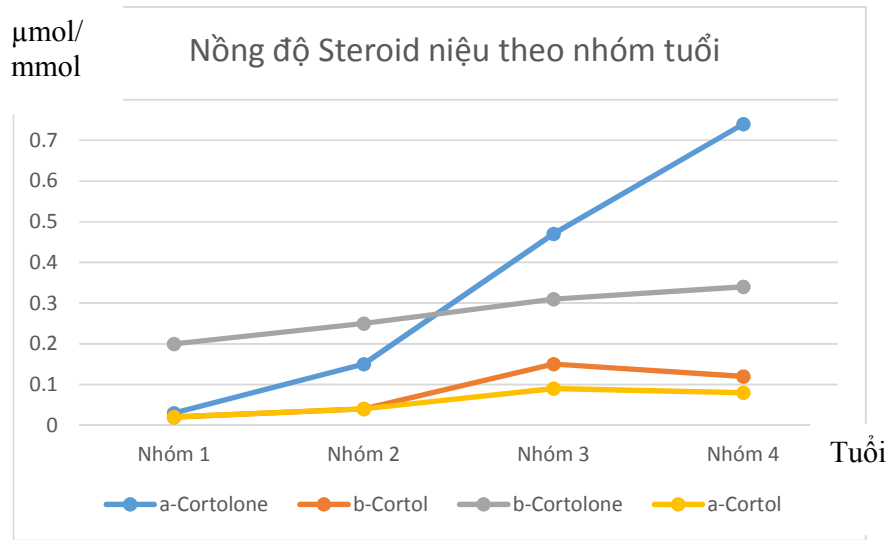
Sự phân bố nồng độ An ở trẻ nam trong độ tuổi 8 - ≤11 không theo quy luật chuẩn, phần lớn dữ liệu tập trung ở bên trái biểu đồ.

3.2.2. Khoảng tham chiếu nồng độ các steroid niệu

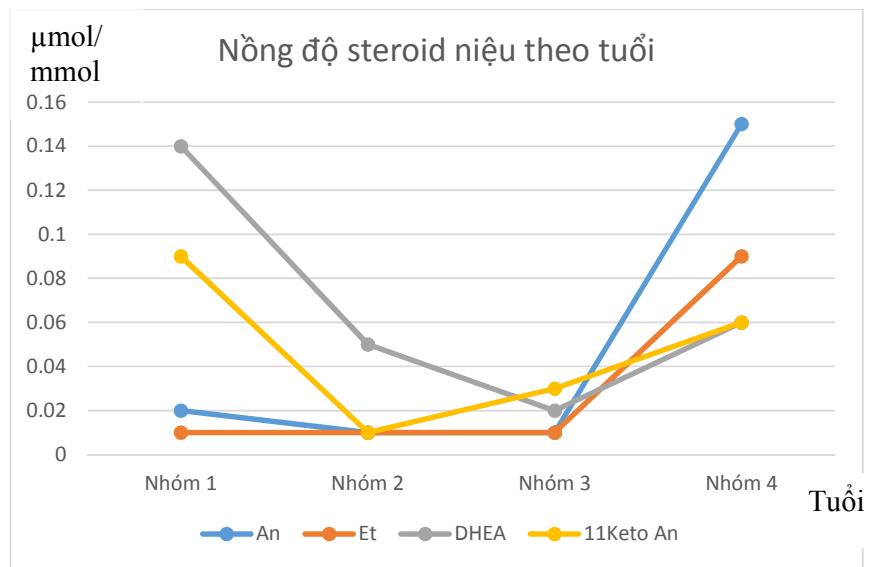
Bảng 3.6. So sánh nồng độ steroid niệu giữa các nhóm tuổi

Steroid niệu	Giá trị trung vị (min-max) ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)				P
	Nhóm 1 (n=64)	Nhóm 2 (n=61)	Nhóm 3 (n=74)	Nhóm 4 (n=70)	
An	0,02 (0-0,56)	0,01 (0-0,71)	0,01 (0,0-0,35)	0,15 (0,01-1,08)	0,000
Et	0,01 (0-0,43)	0,0 (0- 0,71)	0,01 (0,0- 0,19)	0,09 (0,01-0,60)	0,000
DHEA	0,14 (0,01- 3,03)	0,05 (0,0- 1,29)	0,02 (0,0- 1,01)	0,06 (0,01-1,49)	0,000
11 Keto An	0,09 (0,01- 1,25)	0,01 (0- 0,71)	0,03 (0,0- 1,32)	0,06 (0,0- 0,60)	0,000
11 OH An	0,02 (0-0,22)	0,03 (0-1,05)	0,08 (0,0-0,78)	0,23 (0,01-0,81)	0,000
11 OH Et	0,02 (0- 0,20)	0,01 (0- 0,71)	0,01 (0,0- 0,43)	0,01 (0,01- 0,29)	0,001
PD	0,10 (0-1,33)	0,01 (0-0,71)	0,02 (0,0-1,02)	0,04 (0,01-0,52)	0,000
PT	0,04 (0-1,03)	0,03 (0-0,71)	0,04 (0,0-0,87)	0,08 (0,0-0,36)	0,000
A'3	0,92 (0,04-123,6)	0,17 (0-6,89)	0,02 (0,0-0,76)	0,02 (0,0-0,20)	0,000
THE	0,82 (0,09-14,4)	0,93 (0,05-22,1)	1,77 (0,02-18,2)	2,6 (0,01-6,13)	0,000
THF	0,17 (0,01-4,11)	0,15 (0,02-1,46)	0,49 (0,01-5,24)	0,63 (0,01-1,37)	0,000
5 α -THF	0,33 (0,01-15,7)	0,21 (0,02-3,33)	0,73 (0,02-12,4)	0,65 (0,03-1,97)	0,000
α -Cortolone	0,03 (0,0-0,33)	0,15 (0-3,47)	0,47 (0,01-16,1)	0,74 (0,03-1,68)	0,000
β -Cortol	0,02 (0-0,43)	0,04 (0-0,71)	0,15 (0,01-3,9)	0,12 (0,01-0,36)	0,000
β -Cortolone	0,2 (0,01-3,54)	0,25 (0,01-12,3)	0,31 (0,01-8,7)	0,34 (0,02-0,82)	0,000
α -Cortol	0,02 (0-0,72)	0,04 (0-2,05)	0,09 (0,0-4,0)	0,08 (0,01-0,43)	0,000
THS	0,01 (0-0,20)	0,01 (0-0,71)	0,01 (0,0-0,10)	0,01 (0,0-0,04)	0,000

Có sự khác biệt rõ rệt về nồng độ các sản phẩm steroid niệu theo nhóm tuổi với $p \leq 0,001$ (kiểm định Kruskal – Wallis)



Biểu đồ 3.7. Nồng độ Cortolone và Cortol theo tuổi



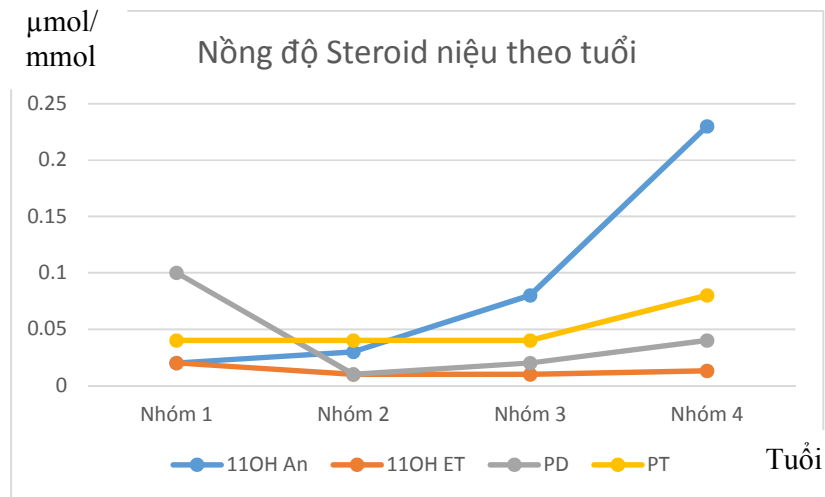
Biểu đồ 3.8. Nồng độ An, Et, DHEA, 11Keto An theo tuổi

An: Androsterone

Et: Etiocholanolone

DHEA: Dehydroepiandrosterone

11Keto An: 11keto Androsterone



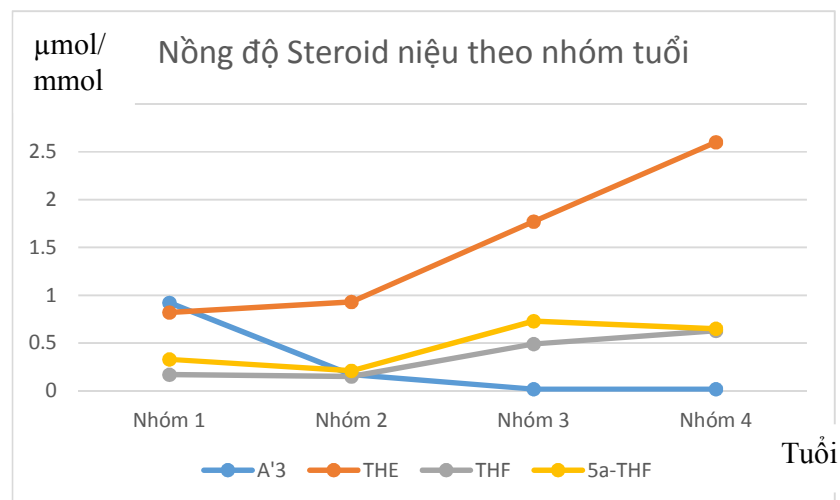
Biểu đồ 3.9. Nồng độ 11OH An, 11OH Et, PD, PT theo tuổi

11OH An: 11OH-Androsterone

11OH Et: 11OH-Etiocholanolone

PD: Pregnanediol

PT: Pregnanetriol



Biểu đồ 3.10. Nồng độ A'3, THE, THF, 5α-THF theo tuổi

A'3: Androstentriol

THF: Tetrahydrocortisol

THE: Tetrahydrocortisone

5α-THF: 5α-tetrahydrocortisol

Sự biến đổi nồng độ steroid niệu theo tuổi cho thấy nồng độ A'3, DHEA, 11keto An cao ở trẻ sơ sinh giảm dần ở trẻ 1 tháng - 2 tuổi và tăng cao ở trẻ >8 tuổi. Nồng độ THE, THF 5α-THF tăng cao dần ở trẻ > 2 tuổi.

Bảng 3.7. Khoảng tham chiếu steroid niệu ở trẻ sơ sinh

<i>Steroid niệu</i>	<i>Giá trị trung vị (min-max)</i> <i>($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)</i>			Khoảng tham chiếu
	<i>Nam (n=34)</i>	<i>Nữ (n=30)</i>	<i>p*</i>	
An	0,02(0 – 0,56)	0,02(0 – 0,09)	0,536	0 – 0,1
Et	0,02(0 – 0,43)	0,01(0 – 0,28)	0,201	0 – 0,09
DHEA	0,14(0,01 – 3,03)	0,14(0,02 – 0,47)	0,909	0,01 – 0,68
11 Keto-An	0,09(0,01 – 0,71)	0,09(0,01 – 1,25)	0,393	0,01 – 0,58
11OH-An	0,03(0 – 0,22)	0,02(0 – 0,18)	0,706	0 – 0,20
11OH Et	0,02(0 – 0,10)	0,03(0,01 – 0,20)	0,058	0 – 0,14
PD	0,12(0 – 1,32)	0,08(0,02 – 0,56)	0,447	0 – 0,55
PT	0,05(0,01–1,03)	0,04(0 – 0,13)	0,156	0 – 0,25
A'3	1,74(0,06 – 123,6)	0,47(0,04 – 12,4)	0,211	0,05 – 18,9
THE	0,77(0,09 – 14,4)	0,92(0,31 – 1,84)	0,310	0,16 – 2,76
THF	0,19(0,01 – 4,11)	0,16(0,01 – 0,90)	0,389	0,01 – 0,87
5 α -THF	0,3(0,04 – 15,7)	0,36(0,01 – 4,13)	0,893	0,02 – 4,0
α -Cortolone	0,03(0,01 – 0,33)	0,03(0 – 0,09)	0,357	0 – 0,20
β -Cortol	0,02(0 – 0,43)	0,02(0 – 0,05)	0,404	0 – 0,12
β -Cortolone	0,19(0,01 – 3,54)	0,2(0,03 – 0,42)	0,609	0,02 – 0,68
α -Cortol	0,03(0 – 0,72)	0,02(0 – 0,53)	0,170	0 – 0,53
THS	0,01(0 – 0,20)	0,01(0 – 0,1)	0,552	0 – 0,10

* Kiểm định Mann-Withney cho biến phân bố không theo quy luật chuẩn.

Không có sự khác biệt nồng độ các steroid niệu giữa nam và nữ ở trẻ sơ sinh ($p > 0,05$). Mẫu nước tiểu trẻ sơ sinh chứa các steroid DHEA, A'3, THE, THF, 5 α -THF, β -cortolone trong khi các steroid niệu khác rất thấp.

Bảng 3.8. Khoảng tham chiếu steroid niệu của trẻ 1 tháng - < 2 tuổi

<i>Steroid niệu</i>	<i>Giá trị trung vị (min-max)</i> $\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$			Khoảng tham chiếu
	<i>Nam (n = 31)</i>	<i>Nữ (n = 30)</i>	<i>p*</i>	
An	0,01(0 – 0,71)	0(0 – 0,18)	0,051	(0 – 0,1
Et	0 (0 – 0,71)	0 (0 – 0,18)	0,548	0 – 0,1
DHEA	0,05(0 – 1,29)	0,05(0 – 0,87)	0,862	0 – 0,86
11 Keto-An	0,01(0 – 0,71)	0,01(0 – 0,28)	0,473	0 – 0,26
11OH-An	0,02(0 – 0,79)	0,04(0 – 1,05)	0,278	0 – 0,70
11OH Et	0,01(0 – 0,71)	0,01(0 – 0,18)	0,493	0 – 0,17
PD	0,01(0 – 0,71)	0,01(0 – 0,18)	0,857	0 – 0,17
PT	0,03(0 – 0,71)	0,04(0,01 – 0,31)	0,024	Nam: 0 – 0,36 Nữ: 0,01–0,25
A'3	0,15(0 – 6,89)	0,17(0 – 5,5)	0,942	0 – 5,42
THE	0,93(0,05 – 22,1)	0,97(0,1 – 6,76)	0,634	0,08 – 6,6
THF	0,15(0,02 – 0,91)	0,11(0,02 – 1,46)	0,507	0,02 – 0,9
5 α -THF	0,22(0,02 – 1,93)	0,17(0,02 – 3,33)	0,428	0,02 – 2,47
α -Cortolone	0,15(0 – 0,71)	0,15(0 – 3,47)	0,540	0 – 1,15
β -Cortol	0,05(0 – 0,71)	0,03(0 – 0,18)	0,660	0 – 0,19
β -Cortolone	0,28(0,01 – 1,09)	0,22(0,02 – 12,3)	0,729	0,01 – 1,17
α -Cortol	0,04(0 – 0,71)	0,05(0 – 2,05)	0,398	0 – 0,67
THS	0,01(0 – 0,71)	0,01(0 – 0,10)	0,702	0 – 0,10

* Kiểm định Mann-Whitney cho biến phân bố không theo quy luật chuẩn.

Không có sự khác biệt nồng độ các steroid niệu giữa nam và nữ với ($p > 0,05$) ngoại trừ PT ở nữ cao hơn nam ($p = 0,024$). Phần lớn các sản phẩm chuyển hóa steroid niệu rất thấp ở trẻ 1 tháng đến < 2 tuổi.

Bảng 3.9. Khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ 2 - < 8 tuổi

<i>Steroid niệu</i>	<i>Giá trị trung vị (min-max)</i> $\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$			<i>Khoảng tham chiếu</i>
	<i>Nam (n=43)</i>	<i>Nữ (n=31)</i>	<i>p*</i>	
An	0,01(0 – 0,35)	0,02(0 – 0,22)	0,063	0 – 0,17
Et	0,01(0 – 0,19)	0,01(0 – 0,14)	0,199	0 – 0,12
DHEA	0,02(0 – 1,01)	0,02(0 – 0,39)	0,606	0 – 0,26
11 Keto-An	0,03(0 – 0,34)	0,02(0 – 1,32)	0,383	0 – 0,29
11OH-An	0,09(0 – 0,78)	0,08(0 – 0,52)	0,900	0 – 0,28
11OH Et	0,02(0 – 0,11)	0,01(0 – 0,43)	0,759	0 – 0,10
PD	0,03(0 – 1,02)	0,02(0 – 0,38)	0,730	0 – 0,49
PT	0,04(0 – 0,23)	0,05(0,01 – 0,87)	0,159	0 – 0,18
A'3	0,03(0 – 0,42)	0,02(0 – 0,76)	0,755	0 – 0,30
THE	1,88(0,02 – 4,46)	1,75(0,02 – 18,2)	0,943	0,02 – 4,34
THF	0,5(0,01 – 1,31)	0,45(0,03 – 5,24)	0,529	0,03 – 1,14
5 α -THF	0,77(0,02 – 2,87)	0,64(0,03 – 12,4)	0,352	0,03 – 2,43
α -Cortolone	0,46(0,01 – 2,87)	0,49(0,01 – 16,1)	0,822	0,01 – 2,74
β -Cortol	0,15(0,01 – 0,46)	0,15(0 – 3,9)	0,726	0,01 – 0,33
β -Cortolone	0,3(0 – 0,89)	0,32(0,01 – 8,7)	0,714	0 – 0,82
α -Cortol	0,1(0 – 0,83)	0,09(0 – 4,0)	0,697	0 – 0,6
THS	0,01(0 – 0,10)	0,01(0 – 0,04)	0,136	0 – 0,04

*Kiểm định Mann-Whitney cho biến phân bố không theo quy luật chuẩn.

Ở trẻ từ 2 - < 8 tuổi, các sản phẩm steroid của androgen (An, Et) còn thấp; các sản phẩm steroid của cortisol (THE, THF, 5 α -THF, cortolone và cortol) có xu hướng tăng so với nhóm tuổi nhỏ hơn.

Bảng 3.10. Khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ 8 - ≤11 tuổi

Steroid niệu	Giá trị trung vị (min-max) μmol/mmol creatinine			Khoảng tham chiếu
	Nam (n=29)	Nữ (n=41)	p*	
An	0,12 (0,01 – 0,40)	0,19 (0,01 – 1,08)	0,022	Nam: 0,01 – 0,38 Nữ: 0,01 – 0,86
Et	0,06 (0,0 – 0,31)	0,13 (0,01 – 0,60)	0,034	Nam: 0 – 0,29 Nữ: 0,01 – 0,46
DHEA	0,07 (0,01 – 1,49)	0,06 (0 – 0,45)	0,952	0,01 – 0,22
11 Keto-An	0,05 (0,01 – 0,46)	0,09 (0,01 – 0,60)	0,044	Nam: 0,01 – 0,39 Nữ: 0,01 – 0,45
11OH-An	0,17 (0,02 – 0,67)	0,24 (0,01 – 0,81)	0,186	0,01 – 0,52
11OH Et	0,01 (0,0 – 0,15)	0,02 (0 – 0,29)	0,007	Nam: 0 – 0,13 Nữ: 0 – 0,21
PD	0,03 (0,0 – 0,13)	0,05 (0,01 – 0,52)	0,043	Nam: 0 – 0,12 Nữ: 0,01 – 0,23
PT	0,07 (0,0 – 0,16)	0,1 (0,01 – 0,36)	0,001	Nam: 0-0,16 Nữ: 0,01-0,24
A'3	0,02 (0,0 – 0,20)	0,02 (0 – 0,18)	0,788	0 – 0,15
THE	3,01 (0,19 – 6,13)	2,45 (0,07 – 5,44)	0,204	0,17 – 5,08
THF	0,65 (0,02 – 1,37)	0,59 (0,01 – 1,13)	0,482	0,02 – 1,11
5α-THF	0,62 (0,03 – 1,54)	0,68 (0,03 – 1,97)	0,734	0,03 – 1,51
α-Cortolone	0,76 (0,03 – 1,38)	0,7 (0,04 – 1,68)	0,655	0,03 – 1,37
β-Cortol	0,12 (0,01 – 0,36)	0,12 (0,02 – 0,30)	0,948	0,02 – 0,27
β-Cortolone	0,38 (0,07 – 0,82)	0,34 (0,02 – 0,64)	0,411	0,06 – 0,64
α-Cortol	0,08 (0,02 – 0,43)	0,08 (0,01 – 0,18)	0,180	0,01 – 0,18
THS	0,01 (0 – 0,04)	0,01 (0 – 0,03)	0,881	0 – 0,03

*Kiểm định Mann-Whitney cho biến phân bố không theo quy luật chuẩn.

Ở trẻ 8 - ≤11 tuổi, hầu hết các steroid niệu cao hơn nhóm tuổi trước, nồng độ An, Et, 11Keto An, 11OH Et, PD, PT ở nữ cao hơn ở nam (p < 0,05).

3.2.3. Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán

Sự phân bố của các tỷ lệ chẩn đoán không tuân theo quy luật chuẩn chuẩn nên giá trị trung vị, giá trị thấp nhất và giá trị cao nhất được sử dụng để so sánh giữa các khoảng tuổi.

Bảng 3.11. So sánh tỷ lệ chẩn đoán giữa các nhóm tuổi

Tỷ lệ chẩn đoán	Giá trị trung vị, (min-max)				p*
	Nhóm 1 (n=64)	Nhóm 2 (n=61)	Nhóm 3 (n=74)	Nhóm 4 (n=70)	
PT/ (THE +THF +5 α -THF)	0,03 (0,0-0,33)	0,02 (0,0-0,16)	0,02 (0,0-0,20)	0,02 (0,01-0,31)	0,001
THS/ (THE +THF +5 α -THF)	0,05 (0,0-0,33)	0,01 (0,0- 0,23)	0,002 (0,0- 0,11)	0,002 (0,0-0,02)	0,000
5 α -THF/THF	1,77 (0,14- 19,7)	1,0 (0,3- 10,8)	1,51 (0,39 - 4,1)	1,06 (0,20- 2,6)	0,007
THF/5 α -THF	0,56 (0,05 – 7,10)	1,00 (0,09 – 3,33)	0,66 (0,24 – 2,59)	0,95 (0,38 – 4,95)	0,000
DHEA/(THE +THF +5 α -THF)	0,09 (0,01-1,59)	0,03 (0,0-0,82)	0,01 (0,0-0,43)	0,02 (0,0-0,23)	0,000
(THF +5 α -THF) /THE	0,75 (0,05-4,96)	0,55 (0,03-2,6)	0,71 (0,29-4,0)	0,50 (0,29-0,95)	0,000
An/Et	Không xác định	Không xác định	1,0 (0,0 – 5,0)	1,61 (1,0 – 3,09)	0,007
Et/An	Không xác định	0,79 (0,0-4,0)	0,72 (0,0-5,0)	0,59 (0,25-1,16)	0,001

*Kiểm định Kruskal-Wallis giữa 4 nhóm.

Có sự khác biệt giữa các nhóm tuổi của các tỷ lệ với $p < 0,01$.

Tỷ lệ An/Et và Et/An không xác định ở trẻ < 2 tuổi do nồng độ An và Et thấp.

Bảng 3.12. Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán cho trẻ sơ sinh

<i>Tỷ lệ chẩn đoán</i>	<i>Giá trị trung vị, (min-max)</i>			<i>Khoảng tham chiếu</i>
	Nam (n= 34)	Nữ (n= 30)	p*	
PT/ (THE +THF +5 α -THF)	0,03 (0,003-0,33)	0,02 (0,0-0,13)	0,028	Nam: 0-0,19 Nữ: 0-0,11
THS/ (THE +THF +5 α -THF)	0,01 (0,0-0,33)	0,01 (0,0-0,17)	0,887	0,0-0,11
5 α -THF/THF	1,69 (0,35-8,0)	2,19 (0,14-19,7)	0,316	0,27-12,0
THF/5 α -THF	0,59 (0,13-1,85)	0,46 (0,05-4,0)	0,316	0,06-1,49
(THF +5 α -THF) /THE	0,68 (0,12-4,96)	0,83 (0,05-2,95)	0,657	0,06-2,94
DHEA/ (THE +THF +5 α -THF)	0,1 (0,01 – 1,59)	0,09 (0,01 - 0,26)	0,726	0,01 – 0,31

Tỷ lệ PT/ (THE +THF +5 α -THF) ở trẻ sơ sinh nam cao hơn nữ ($p < 0,05$), các tỷ khác không có sự khác biệt giữa nam và nữ nên được thiết lập khoảng tham chiếu chung.

Tỷ lệ An/Et và Et/An không xác định ở trẻ sơ sinh do nồng độ An và Et rất thấp, phần lớn dưới giới hạn định lượng nên không xác định và không thiết lập được khoảng tham chiếu.

Bảng 3.13. Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán cho trẻ 1 tháng-<2 tuổi

<i>Tỷ lệ chẩn đoán</i>	<i>Giá trị trung vị, (min-max)</i>			<i>Khoảng tham chiếu</i>
	Nam (n= 31)	Nữ (n= 30)	p*	
PT/ (THE +THF +5 α -THF)	0,02 (0,0-0,12)	0,03 (0,0-0,16)	0,053	0-0,09
THS/ (THE +THF +5 α -THF)	0,01 (0,0-0,22)	0,01 (0,0-0,23)	0,851	0-0,09
5 α -THF/THF	1,8 (0,3-10,8)	1,0 (0,5-10,4)	0,755	0,39-10,18
THF/5 α -THF	0,56 (0,09-2,65)	1,0 (0,1-2,0)	0,755	0,09-2,18
(THF +5 α -THF) /THE	0,52 (0,04-2,6)	0,57 (0,03-1,5)	0,192	0,003-1,59
DHEA/(THE+THF+5 α -THF)	0,05 (0,0 – 0,82)	0,02 (0,0 - 0,69)	0,654	0,0 – 0,69
Et/An	0,83 (0,0-2,0)	0,75 (0,0-2,1)	0,547	0,0-2,1

* Kiểm định Mann-Withney dành cho biến phân bố không chuẩn.

Không có sự khác biệt tỷ lệ chẩn đoán giữa nam và nữ ($p>0,05$) nên khoảng tham chiếu được thiết lập chung cho cả hai giới. Tỷ lệ An/Et không xác định ở trẻ 1 tháng- 2 tuổi do nồng độ Et rất thấp dưới giới hạn định lượng.

Bảng 3.14. Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán cho trẻ 2-<8 tuổi

<i>Tỷ lệ chẩn đoán</i>	<i>Giá trị trung vị, (min-max)</i>			<i>Khoảng tham chiếu</i>
	Nam (n= 43)	Nữ (n= 31)	p*	
PT/ (THE +THF +5 α -THF)	0,02 (0,0-0,20)	0,02 (0,0-0,14)	0,200	0,0-0,07
THS/ (THE +THF +5 α -THF)	0,05 (0,0-0,11)	0,06 (0,0-0,12)	0,33	0-0,10
5 α -THF/THF	1,52 (0,42-4,1)	1,47 (0,39-3,9)	0,793	0,42-3,33
THF/5 α -THF	0,66 (0,24-1,32)	0,68 (0,26-1,82)	0,793	0,25-1,31
(THF +5 α -THF) /THE	0,71 (0,43-4,0)	0,72 (0,29-2,5)	0,543	0,37-1,47
An/Et	1,0 (0,2-5,0)	1,60 (0,0-4,0)	0,032	Nam: 0,2-4,3 Nữ: 0,0-3,83
Et/An	0,91 (0,0-5,0)	0,75 (0,0-4,0)	0,547	0,0-2,1
DHEA/(THE +THF +5 α -THF)	0,01 (0,0-0,33)	0,01 (0,0-0,43)	0,943	0-0,13

* Kiểm định Mann-Withney dành cho biến phân bố không chuẩn.

Tỷ lệ THS/(THE +THF +5 α -THF) rất thấp, không khác biệt giữa nam và nữ. Tỷ lệ An/Et có sự khác biệt giữa nam và nữ, tỷ lệ này có giá trị chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 ở nam nên thường được so sánh với nam cùng tuổi. Các tỷ lệ khác không khác biệt giữa nam và nữ ($p > 0,05$).

Bảng 3.15. Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán cho trẻ 8 - ≤ 11 tuổi

Tỷ lệ chẩn đoán	Giá trị trung vị, (min-max)			Khoảng tham chiếu
	Nam (n= 29)	Nữ (n= 41)	p*	
PT/ (THE +THF +5α-THF)	0,015 (0,006-0,06)	0,03 (0,012-0,31)	0,000	Nam: 0,01-0,06 Nữ: 0,01-0,15
THS/ (THE +THF +5α-THF)	0,02 (0,0-0,18)	0,01 (0,0-0,16)	0,663	0-0,10
5α-THF/THF	1,01 (0,20-2,6)	1,16 (0,52-2,15)	0,343	0,45-2,06
THF/5α-THF	0,99 (0,38-3,31)	0,86 (0,47-1,85)	0,343	0,45 – 1,82
(THF +5α-THF) /THE	0,48 (0,31-0,95)	0,54 (0,29-0,85)	0,045	Nam: 0,31-0,82 Nữ: 0,29-0,78
An/Et	1,61 (1,0-3,09)	1,75 (0,86-4,07)	0,343	0,95-2,89
Et/An	0,62 (0,32-1,0)	0,57 (0,25-1,02)	0,343	0,31-1,01
DHEA/(THE +THF +5α-THF)	0,02 (0,002-0,19)	0,02 (0,003-0,234)	0,757	0-0,17

* Kiểm định Mann-Whitney dành cho biến phân bố không chuẩn.

Tỷ lệ PT/ (THE +THF +5α-THF) và tỷ lệ THE / (THF +5α-THF) có sự khác nhau giữa nam và nữ (p< 0,05).

3.3. Chẩn đoán rối loạn tổng hợp hormon steroid

3.3.1. Đặc điểm nhóm bệnh

200 người bệnh được lấy mẫu làm xét nghiệm định lượng steroid niệu trong đó 138 được chẩn đoán TSTTBS hoặc theo dõi TSTTBS, 44 người được chẩn đoán RLPTGT, 5 người được chẩn đoán rối loạn điện giải, 7 người được chẩn đoán dậy thì sớm, 6 người được chẩn đoán sạm da, suy thượng thận, cường aldosterone.

Bảng 3.16. Đặc điểm của nhóm bệnh

<i>Tuổi</i>	<i>Giới tính</i>		<i>Điều trị hormon</i>		<i>Tổng số n (%)</i>
	<i>Nam</i>	<i>Nữ</i>	<i>Chưa ĐT</i>	<i>Đã ĐT</i>	
1-28 ngày	28	16	24	20	44 (22%)
1 tháng - <2 tuổi	41	17	38	20	58 (29%)
2 - < 8 tuổi	28	24	34	18	52 (26%)
8 - ≤11 tuổi	10	7	8	9	17 (8,5%)
> 11 tuổi	15	14	12	17	29 (14,5%)
Tổng số	122	78	116	84	200
	(61%)	(39%)	(58,0%)	(42,0%)	(100%)

ĐT: điều trị

Trong số 200 người bệnh được làm định lượng steroid niệu có 122 nam (61%), 78 nữ (39%), 116 người bệnh chưa điều trị hormon (58,0%).

Bảng 3.17. Phân loại chẩn đoán rối loạn tổng hợp steroid theo tuổi

<i>Thiếu enzym</i>	<i>1-28 ngày</i>	<i>1 tháng- <2 tuổi</i>	<i>2-<8 tuổi</i>	<i>8 - ≤11 tuổi</i>	<i>>11 tuổi</i>	<i>Tổng số n (%)</i>
21-OH	27	28	26	8	16	106 (53%)
11β-OH	0	2	2	0	1	5 (2,5%)
5α-reductase 2	0	3	7	2	2	14 (7%)
3β-HSD II	0	0	0	0	1	1 (0,5%)
Chưa xác định	17	25	16	7	9	74 (37%)
Tổng số (n)	44	58	52	17	29	200 (100%)
(%)	(22%)	(29%)	(26%)	(24%)	(14,5%)	

Trong tổng số 200 người bệnh được làm xét nghiệm định lượng steroid niệu bằng GC/MS, có 126/200 người bệnh được xác định có rối loạn sinh tổng hợp steroid, 74/200 người bệnh chưa phát hiện rối loạn sinh tổng hợp steroid điển hình.

Bảng 3.18. Đặc điểm nhóm chưa điều trị

Chẩn đoán	1-28 ngày	1 tháng- <2 tuổi	2-<8 tuổi	8 - ≤11 tuổi	> 11 tuổi	Tổng số n
21-OH	11	9	13	2	2	37
11β-OH	0	2	1	0	0	3
5α-reductase 2	0	3	7	2	2	14
3β-HSD II	0	0	0	0	1	1
Chưa xác định	13	24	13	4	7	61
Tổng số (n) (%)	24 (20,7%)	38 (32,8%)	34 (29,3%)	8 (6,9%)	12 (10,3%)	116 (100%)

56 người bệnh được chẩn đoán rối loạn tổng hợp hormon steroid khi chưa điều trị trong đó 37/56 người bệnh thiếu 21-OH, 14/56 người bệnh thiếu 5α-reductase. 3 người bệnh thiếu 11β-OH và 1 người bệnh thiếu 3β-HSD II được chẩn đoán dựa vào định lượng steroid niệu.

3.3.2. Đặc điểm người bệnh thiếu 21-OH chưa điều trị

37 người bệnh thiếu 21-OH có 16 nam chiếm 43,24 (%), 21 nữ chiếm 56,76 (%), có 33 người bệnh (89,19%) chẩn đoán trước 8 tuổi, đặc biệt có 4 người bệnh (10,81%) được chẩn đoán sau 8 tuổi trong đó người bệnh được chẩn đoán muộn nhất là người bệnh nữ 17 tuổi, nhiễm sắc thể 46,XX với ngoại hình nam hóa hoàn toàn. 3/4 người bệnh được chẩn đoán muộn sau 8 tuổi là người dân tộc H'mông ở Lào Cai, Hà Giang có điều kiện kinh tế, y tế khó khăn.

Bảng 3.19. So sánh nồng độ steroid niệu nhóm thiếu 21-OH với nhóm chứng

STT	Steroid niệu	Trung vị, (min, max) Đơn vị $\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$		p*
		Nhóm chứng (n=269)	Nhóm bệnh (n=37)	
1	An	0,02 (0,0 – 1,08)	0,49 (0,0-63,71)	0,000
2	Et	0,015 (0,0 – 0,71)	0,22 (0,0-102,8)	0,000
3	DHEA	0,048 (0,0 – 3,03)	0,19 (0,01-29,7)	0,000
4	11 Keto-An	0,045 (0,0 – 1,32)	0,44 (0,01-12,7)	0,000
5	11OH-An	0,056 (0,0 – 1,05)	2,13 (0,01-48,3)	0,000
6	11OH Et	0,015 (0,0 – 0,71)	0,12 (0,0-1,81)	0,000
7	PD	0,036 (0,0 – 1,33)	0,45 (0,04-7,7)	0,000
8	PT	0,048 (0,0 – 1,03)	10,4 (0,04-110,2)	0,000
9	A'3	0,057 (0,0 – 123,6)	0,34 (0,0-15,02)	0,000
10	THE	1,39 (0,02 – 22,14)	1,51 (0,23-53,52)	0,072
11	THF	0,35 (0,01 – 5,24)	0,47 (0,01-20,26)	0,141
12	5 α -THF	0,53 (0,01 – 15,73)	0,46 (0,02-20,69)	0,482
13	α -Cortolone	0,069 (0,0 – 4,04)	0,27 (0,03-6,22)	0,000
14	β -Cortol	0,082 (0,0 – 3,90)	0,09 (0,004-6,52)	0,026
15	β -Cortolone	0,27 (0,0 – 12,32)	0,30 (0,04-28,76)	0,029
16	α -Cortol	0,25 (0,0 – 16,06)	0,067 (0,004-2,92)	0,001
17	THS	0,007 (0,0 – 0,71)	0,013 (0,0-2,07)	0,065

*Kiểm định Mann-Whitney cho phân bố không theo quy luật chuẩn.

Nồng độ các steroid niệu ở người bệnh thiếu 21-OH như An, Et, PT, 11OH An, 11OH Et, PD, PT đều cao hơn so với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Nồng độ THE, THF, 5 α -THF, THS không có sự khác biệt giữa nhóm chứng với nhóm bệnh ($p > 0,05$).

Bảng 3.20. Đặc điểm một số steroid niệu và tỷ lệ chẩn đoán của nhóm thiếu 21-OH

<i>Thông số</i>	<i>PT ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)</i>	<i>PT/(THE + THF + 5α-THF)</i>	<i>DHEA/(THE + THF+5α-THF)</i>
n	37	37	37
Min	0,22	0,02	0,00
Max	110,15	25,81	6,54
Trung vị	10,42	2,28	0,07
Trung bình	13,50	5,46	0,35
Số người có kết quả bình thường	0	5	27

Nồng độ PT cao hơn giá trị tham chiếu ở 100% người bệnh thiếu 21-OH, trong khi đó tỷ lệ PT/(THE +THF+5 α -THF) cao ở 86,5% người bệnh.

Tỷ lệ DHEA/(THE +THF+5 α -THF) cao hơn giới hạn trên của khoảng tham chiếu ở 10/37 người bệnh đều ở độ tuổi > 2 tuổi (27,03%).

Bảng 3.21. Các chỉ số cận lâm sàng của nhóm thiếu 21-OH.

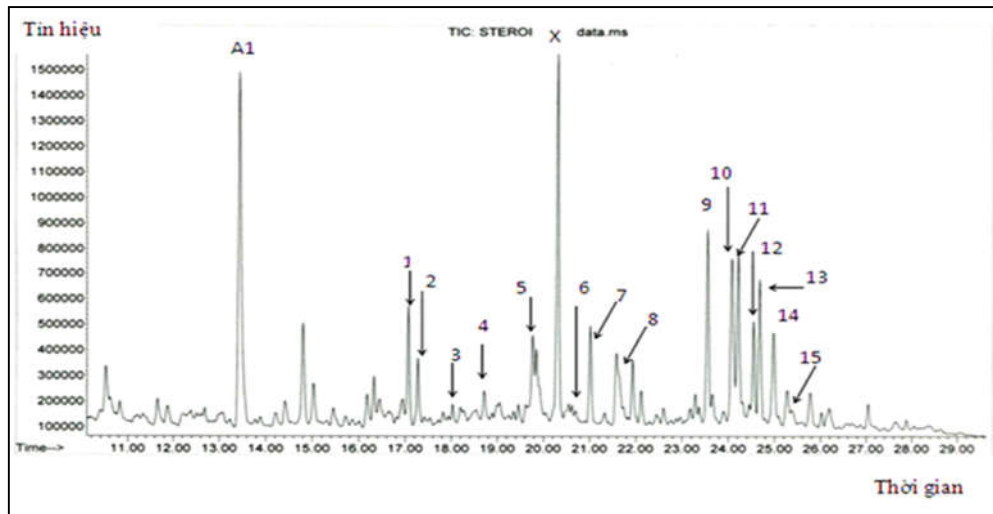
<i>Thông số</i>	<i>17-OHP (ng/mL)</i>	<i>Cortisol 8h (nmol/L)</i>	<i>ACTH (pmol/L)</i>	<i>Natri (mmol/L)</i>	<i>Kali (mmol/L)</i>
n	18	8	8	15	15
Min	2,1	33,64	2,91	101,1	3,4
Max	308,3	713,2	1723,7	144	6,58
Trung vị	29,34	228,8	44,6	136	4,4
Trung bình	61,5	292,7	372,1	132,1	4,6
Giá trị tham chiếu	Theo tuổi *	66 -178	6 - 13	135 -145	3,5 -5,0
Số BN có kết quả bình thường	2	7	2	11	11

*Giá trị tham chiếu nồng độ 17OHP theo tuổi có trong phụ lục 7.

Có 2/18 người bệnh có nồng độ 17-OHP trong giới hạn bình thường.

6/8 người bệnh có nồng độ ACTH cao hơn khoảng tham chiếu.

4 người bệnh có natri thấp <135 mmol/L) và kali > 5,0 mmol/L. Trong đó người bệnh rối loạn điện giải nặng nhất có natri 101,1 và kali 6,58 mmol/L; toàn bộ người bệnh có rối loạn điện giải đều dưới 2 tháng tuổi.

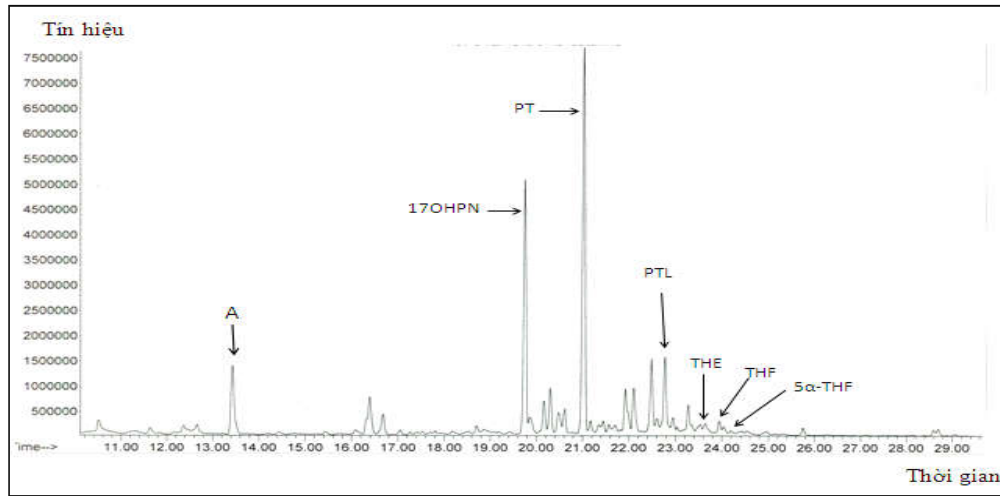


Biểu đồ 3.11. Sắc ký đồ toàn thể của mẫu chuẩn

Sắc ký đồ mẫu chuẩn gồm các đỉnh xuất hiện theo thứ tự thời gian lưu tăng dần như sau:

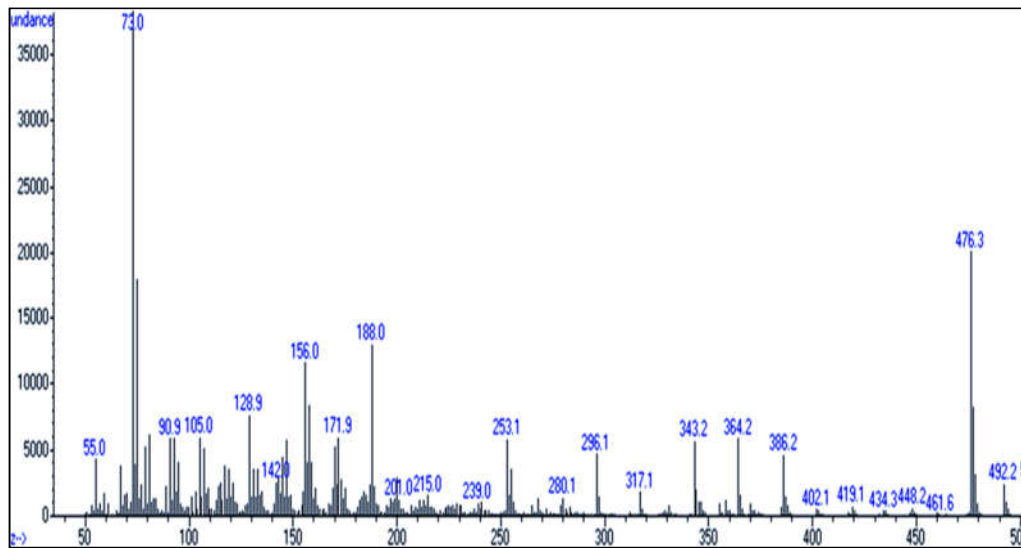
A1: chuẩn nội Androstanol	8: Androstentriol (A'3)
1: Androsterone (An)	9: Tetrahydrocortisone (THE)
2: Etiocholanolone (Et)	10: Tetrahydrocortisol (THF)
3: Dehydroepiandrosterone (DHEA)	11: 5 α -THF
4: 11-Keto androsterone (11-Keto An)	12: α -Cortolone
5: 11-hydroxy androsterone (11OH An)	13: β -Cortol
6: Pregnanediol (PD)	14: β -Cortolone
7: Pregnanetriol (PT)	15: α -Cortol

X là chất chưa xác định.



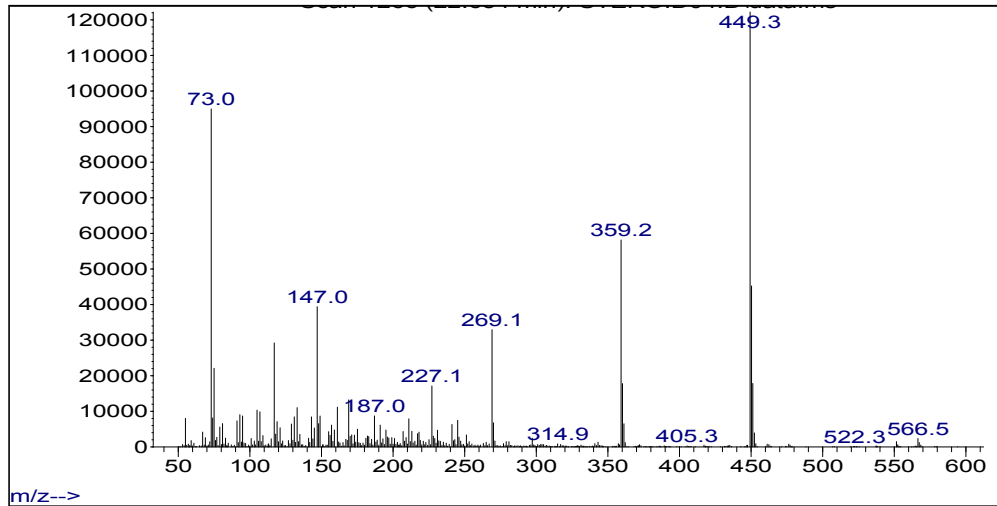
Biểu đồ 3.12. Sắc ký đồ người bệnh thiếu 21-OH.

Có sự xuất hiện đỉnh 17OHPN, PTL mà mẫu bình thường không có. Các đỉnh THE, THF, 5 α -THF có cường độ tín hiệu thấp.



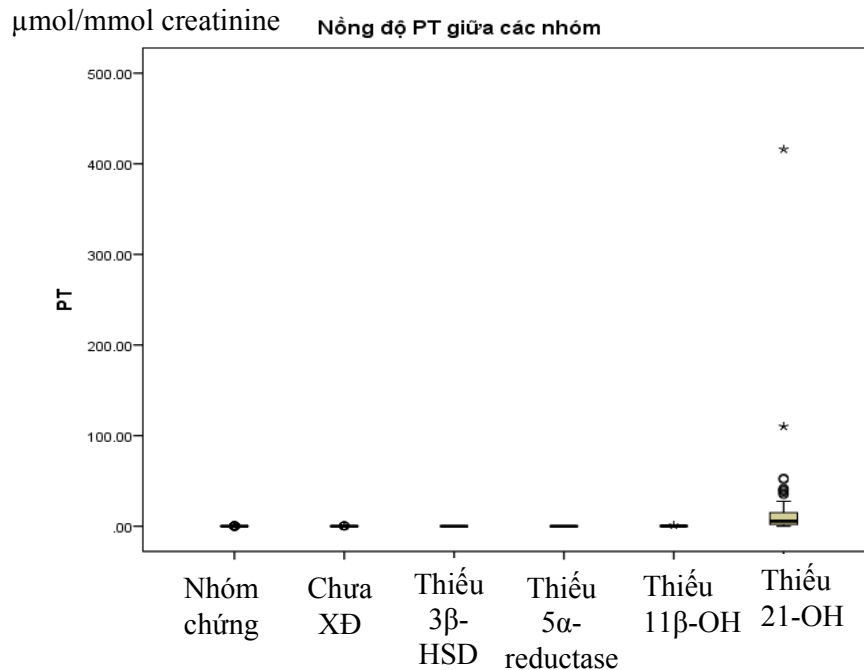
Biểu đồ 3.13. Mẫu ion đặc hiệu của 17-OHPN

17OHPN là sản phẩm tiền chất để tổng hợp cortisol, có mẫu ion đặc trưng là 156, 188, 296, 386, 476 (m/z), thời gian lưu 19,7 phút xuất hiện ở người bệnh TSTTBS do thiếu 21-OH. Sự có mặt của đỉnh 17OHPN trên sắc ký đồ là tiêu chuẩn định tính trong chẩn đoán thiếu enzym 21-OH.

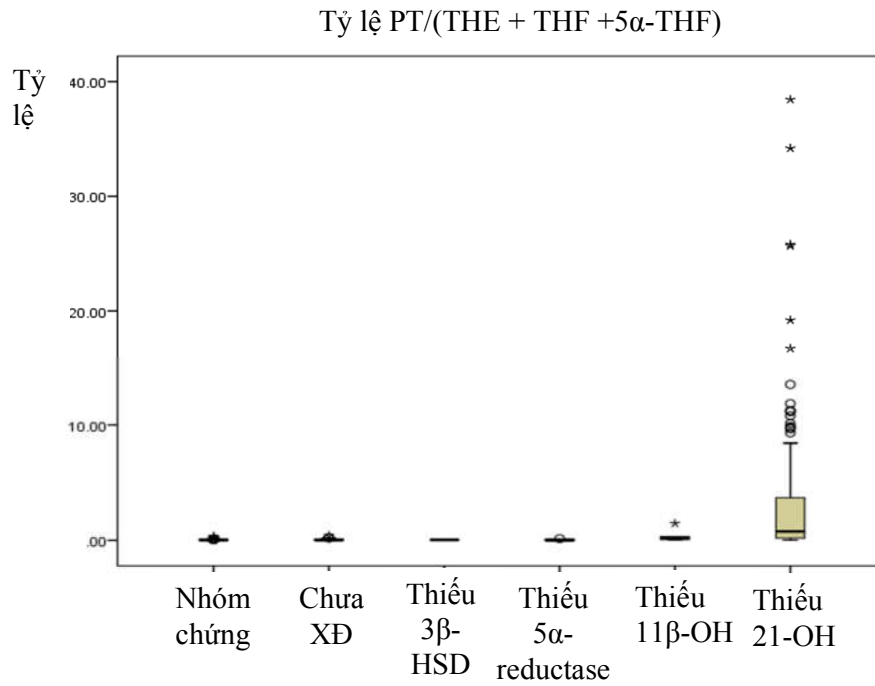


Biểu đồ 3.14. Mẫu ion đặc hiệu cho PTL

Pregnanetriolone (PTL) là sản phẩm chuyển hóa của 21-deoxycortisol với các mảnh ion đặc trưng 269, 359, 449 (m/z), thời gian lưu 22,6 phút. Sự xuất hiện đỉnh PTL là tiêu chuẩn định tính trong chẩn đoán thiếu 21-OH. Đỉnh PTL đặc trưng cho thiếu 21-OH mà không xuất hiện ở sắc ký đồ người bệnh thiếu 11 β -OH và các rối loạn tổng hợp steroid khác.

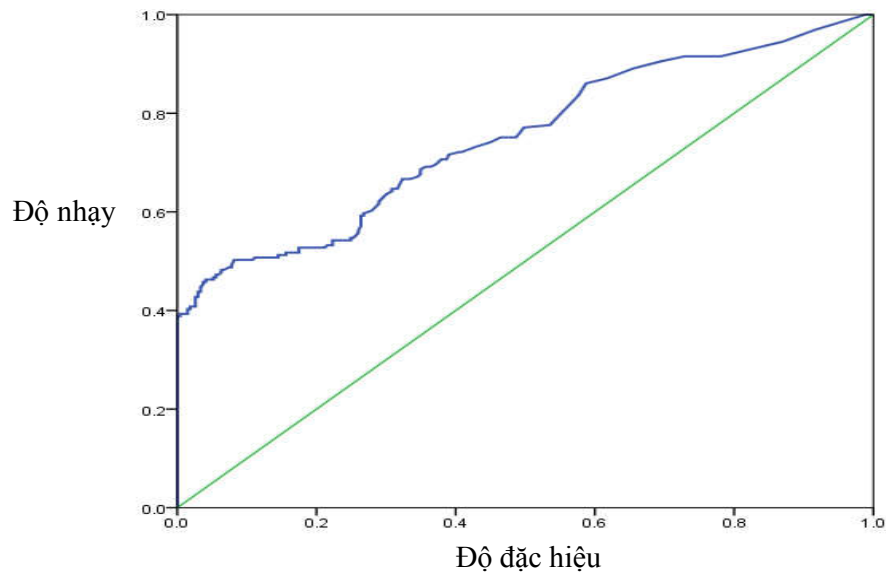


Biểu đồ 3.15. So sánh nồng độ PT giữa các nhóm

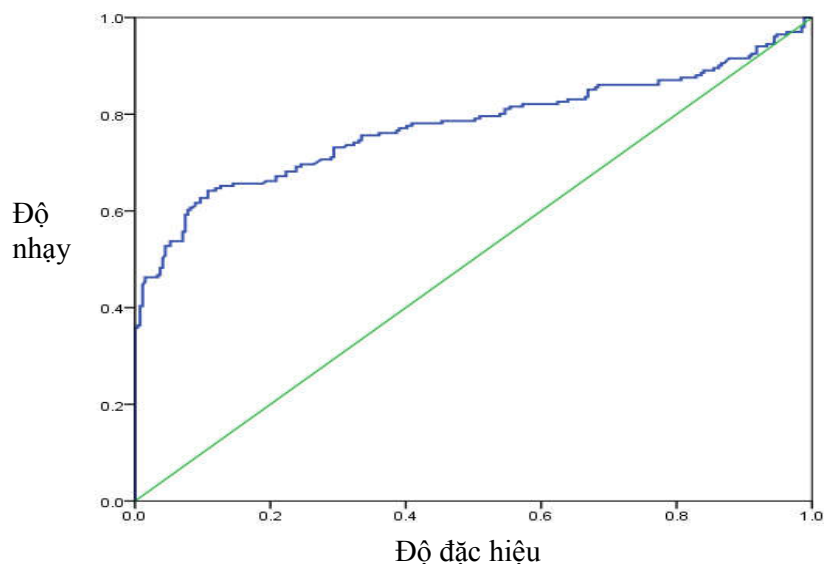


Biểu đồ 3.16. So sánh tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) giữa các nhóm

Tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) cao ở nhóm thiếu 21-OH và một số người bệnh thiếu 11 β -OH.



Biểu đồ 3.17. Biểu đồ ROC cho nồng độ PT



Biểu đồ 3.18. Biểu đồ ROC cho tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF)

Bảng 3.22. Giá trị chẩn đoán thiếu 21-OH của một số thông số

Chỉ số	PT	Tỷ lệ PT/ (THE + THF + 5 α -THF)
Điểm cắt tối ưu	1,875	0,025
Diện tích dưới đường cong (AUC)	0,749	0,775
Độ nhạy	0,463	0,771
Độ đặc hiệu	0,959	0,610
Giá trị dự đoán dương tính	0,894	0,596
Giá trị dự đoán âm tính	0,705	0,781

Diện tích dưới đường cong (AUC) của PT và tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) đều trên 0,7, do vậy giá trị chẩn đoán của hai chỉ số này ở mức khá. Nếu lấy giá trị điểm cắt nồng độ PT là 1,875 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine thì độ đặc hiệu lên đến 95,9% trong chẩn đoán thiếu 21-OH, tuy nhiên do điểm cắt có nồng độ PT cao nên độ nhạy không cao 46,3%. Điểm cắt tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) thấp, nên độ nhạy cao hơn (77,1%), nhưng độ đặc hiệu không cao (61,0%) so với PT. Vì vậy, để chẩn đoán thiếu 21-OH cần xem xét nhiều tiêu

chuẩn, kết hợp cả nồng độ PT, tỷ lệ PT/(THE + THF +5 α -THF) và sự xuất hiện của đỉnh 17 OHPN và PTL trên sắc ký đồ.

3.3.3. Thiếu 11 β -OH chưa điều trị

Có 3 người bệnh nam được chẩn đoán thiếu 11 β -OH khi định lượng steroid niệu bằng GC/MS trước khi điều trị điều trị hydrocortisone.

Bảng 3.23. Đặc điểm người bệnh thiếu 11 β -OH

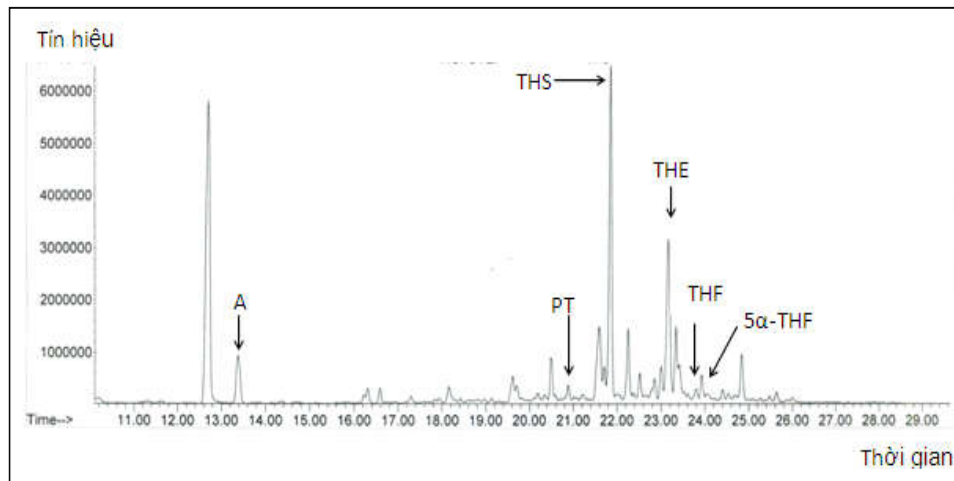
<i>Mã NC</i>	<i>VN102</i>	<i>VN105</i>	<i>VN104</i>
Thời điểm chẩn đoán	3 tháng	15 tháng	5 tuổi
Triệu chứng	Sạm da, tim bẩm sinh.	Dậy thì sớm	Dậy thì sớm
THS (μ mol/mmol)	12,12	0,34	0,09
PT/ (THE +THF +5 α -THF)	0,20	0,05	0,07
THS/ (THE +THF +5 α -THF)	2,25	0,16	0,09
DHEA/(THE +THF +5 α -THF)	0,05	0,002	0,01

Có 3 người bệnh TSTTBS chưa điều trị khi phân tích kết quả có đặc trưng của thiếu 11 β -OH, trong đó người bệnh nhỏ tuổi nhất là 3 tháng, mắc bệnh tim bẩm sinh. Người bệnh lớn nhất 5 tuổi, có dấu hiệu dậy thì sớm, sạm da.

3/3 người bệnh có nồng độ THS và tỷ lệ THS/(THE +THF +5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu tương ứng.

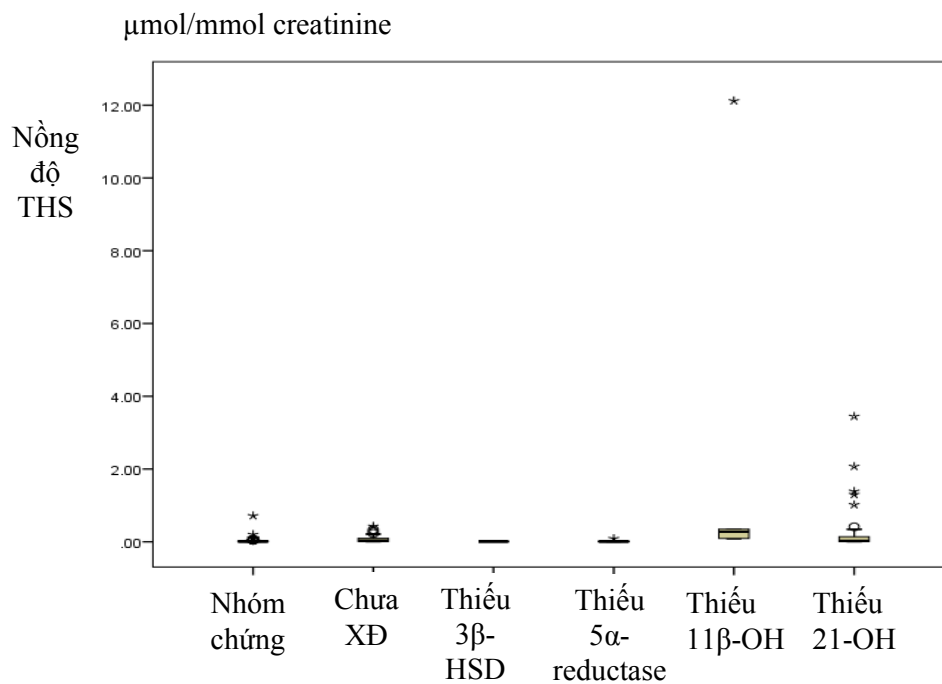
1/3 người bệnh có tỷ lệ PT/(THE +THF +5 α -THF) cao hơn tham chiếu.

Người bệnh VN102 được phân tích gen CYP11B1 phát hiện có đột biến gây bệnh giúp khẳng định chẩn đoán thiếu 11 β -OH.



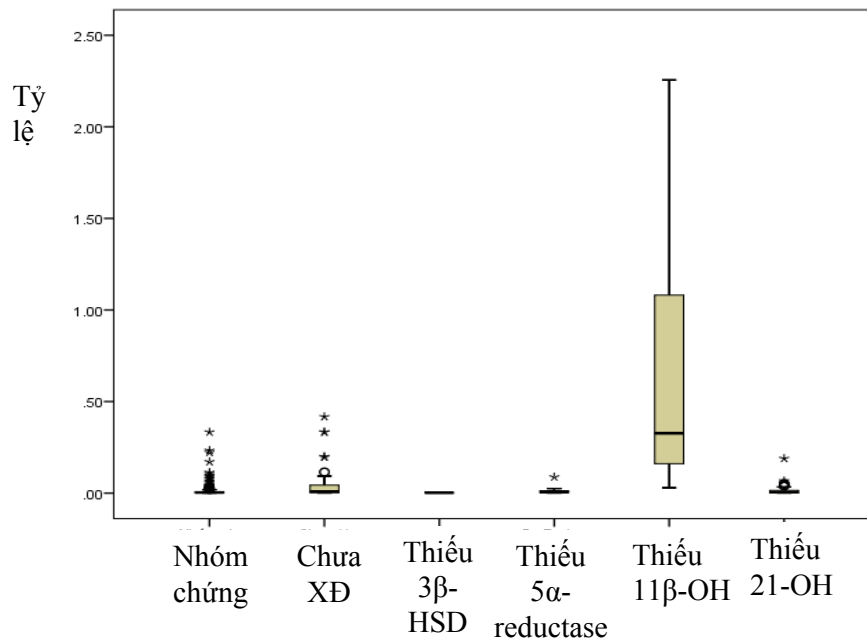
Biểu đồ 3.19. Sắc ký đồ người bệnh thiếu 11 β -OH

Sắc ký đồ người bệnh nam, 3 tháng, thiếu 11 β -OH (mã VN102) có đỉnh THS rất cao so với chuẩn nội và so với mẫu bình thường.



Biểu đồ 3.20. So sánh nồng độ THS giữa các nhóm

Nồng độ THS ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) cao ở nhóm thiếu enzym 11 β -OH và một số người bệnh thiếu 21-OH.



Biểu đồ 3.21. So sánh tỷ lệ THS/(THE+THF+5α-THF) giữa các nhóm

Tỷ lệ THS/(THE + THF + 5α-THF) đặc biệt cao ở người bệnh thiếu enzym 11β-OH so với các nhóm còn lại.

Bảng 3.24. Giá trị chẩn đoán thiếu 11β-OH của một số thông số

Chỉ số	THS	Tỷ lệ THS/ (THE + THF + 5α-THF)
Điểm cắt tối ưu	0,095	0,004
Diện tích AUC	0,731	0,629
Độ nhạy	0,636	0,641
Độ đặc hiệu	0,862	0,599
Giá trị dự đoán dương tính	0,773	0,538
Giá trị dự đoán âm tính	0,763	0,691

Diện tích dưới đường cong của THS > 0,7 trong khi tỷ lệ THS/(THE + THF + 5α-THF) < 0,7. Độ đặc hiệu của nồng độ THS tại điểm cắt 0,095 μmol/mmol creatinine trong chẩn đoán thiếu 11β-OH là 86,2% giúp chẩn đoán phần lớn người bệnh mắc thiếu 11β-OH, tuy nhiên độ nhạy 63,6% nên chưa

phát hiện sớm các trường hợp thiếu 11β -OH. Tỷ lệ THS/(THE + THF + 5α -THF) ở điểm cắt 0,004 có độ nhạy 64,1% và độ đặc hiệu 59,9%.

3.3.4. Thiếu 5α -reductase type 2:

Có 14 người bệnh người bệnh nam (nhiễm sắc thể 46,XY) mắc rối loạn phát triển giới tính với các dấu hiệu nữ hóa được chẩn đoán thiếu 5α -reductase type 2 khi định lượng steroid niệu bằng GC/MS trước khi điều trị.

Bảng 3.25. Kết quả steroid niệu ở người bệnh thiếu 5α -reductase type 2

Mã NB	Tuổi (năm)	5α -THF/THF		THF/ 5α -THF		Tỷ lệ An/Et		Tỷ lệ Et/An	
		Người bệnh	Tham chiếu	Người bệnh	Tham chiếu	Người bệnh	Tham chiếu	Người bệnh	Tham chiếu
VD17	0,5	0,11	0,30-10,8	9,0	0,09-2,65	KXĐ	KXĐ	KXĐ	0,0-2,1
VD21	1,5	0,04		24,0		KXĐ	KXĐ	KXĐ	
VD11	1,9	0,08		13,0		KXĐ	KXĐ	KXĐ	
VN106	2,6	0,01	0,42-4,1	102	0,24-1,32	2,5	0,2-4,3	4,0	0,0-5,0
VN108	3	0,02		40,1		1,0		1,0	
VD18	3,5	0,02		42,6		2,0		0,5	
VD12	4	0,05		18,7		KXĐ		KXĐ	
VD19	5	0,13		7,9		1,0		1,0	
VD14	5,1	0,02		41,0		0,36		2,8	
VD15	5,5	0,03		30		0,40		2,5	
VD13	8,5	0,04		27,3		0,03		34,0	
VD16	10,5	0,03	0,20-2,6	32,3	0,38-3,31	0,20	0,95-2,89	5,04	0,32-1,0
VN107	12,3	0,05		19,2		0,17		5,83	
VD20	12	0,04		23,8		0,35		2,84	

KXĐ: không xác định

NB: người bệnh

14 trẻ thiếu 5α -reductase type 2 có tỷ lệ THF/ 5α -THF cao, tỷ lệ 5α -THF/THF thấp hơn so với khoảng tham chiếu trong độ tuổi tương ứng.

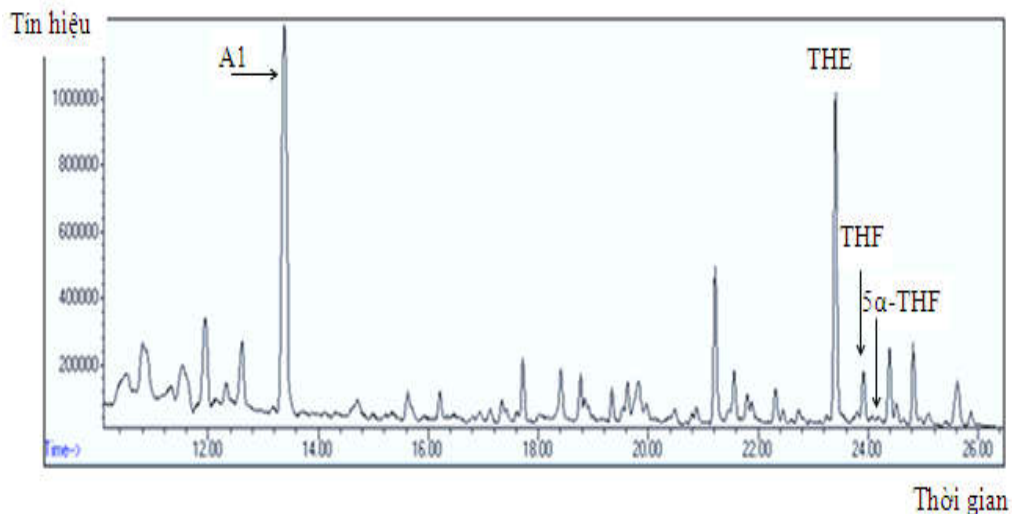
4 trẻ từ 8,5 đến 12,3 tuổi có tỷ lệ Et/An cao hơn khoảng tham chiếu tương ứng và An/Et thấp hơn khoảng tham chiếu tương ứng.

Bảng 3.26. Đặc điểm người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2

Mã NB	NST	Dấu hiệu xuất hiện	Đặc điểm lâm sàng	Thời điểm GC/MS
VD17	46, XY	Khi sinh	Dương vật rất nhỏ <0,5cm, lỗ đái thấp gốc dương vật	0,5 tuổi
VD21	46,XY	Khi sinh	Dương vật nhỏ, lỗ đái thấp ở góc dương vật, bìu chẻ đôi	1,5 tuổi
VD11	46, XY	Khi sinh	Dương vật <1cm, lỗ đái thấp, bìu chẻ đôi giống với nữ.	1,9 tuổi
VN106	46, XY	Khi sinh	Dương vật <1cm, lỗ đái thấp, bìu chẻ đôi, âm tinh hoàn trái.	2,6 tuổi
VN108	46,XY	Khi sinh	Dương vật nhỏ, lỗ đái thấp ở góc dương vật.	3 tuổi
VD18	46, XY	Khi sinh	Dương vật nhỏ <1cm, lỗ đái thấp thể gốc dương vật.	3,5 tuổi
VD12	46, XY	Khi sinh	Ngoại hình nam, dương vật nhỏ <1cm, bìu chẻ đôi, lỗ đái thấp.	4 tuổi
VD19	46, XY	Khi sinh	Dương vật nhỏ <1cm, lỗ đái thấp ở gốc dương vật.	5 tuổi
VD14	46, XY	Khi sinh	Ngoại hình nam, dương vật nhỏ <1,5cm, bìu chẻ đôi, lỗ đái thấp thể gốc dương vật.	5,1 tuổi
VD15	46, XY	Khi sinh	Dương vật nhỏ <1,5cm, lỗ đái thấp thể gốc dương vật, bìu chẻ đôi.	5,5 tuổi
VD13	46, XY	Khi sinh	Ngoại hình nam, dương vật nhỏ <1,5cm, bìu chẻ đôi, lỗ đái thấp ở gốc dương vật.	8,5 tuổi
VD16	46, XY	Khi sinh	Dương vật nhỏ <2cm, lỗ đái thấp thể nặng ở gốc dương vật.	10,5 tuổi
VN107	46, XY	Khi sinh	Ngoại hình nữ, dương vật teo nhỏ <2cm, bìu chẻ đôi, lỗ đái thấp gốc dương vật.	12,3 tuổi
VD20	46, XY	Khi sinh	Ngoại hình nam, dương vật ngắn <2cm, bìu chẻ đôi, lỗ đái thấp gốc dương vật.	12 tuổi

14 người bệnh là nam có bộ nhiễm sắc thể 46,XY và không phát hiện bất thường về mặt nhiễm sắc thể. Trong đó 8/14 người bệnh đã được phân tích gen SRD5A2 và đều có đột biến gây bệnh (phụ lục 6).

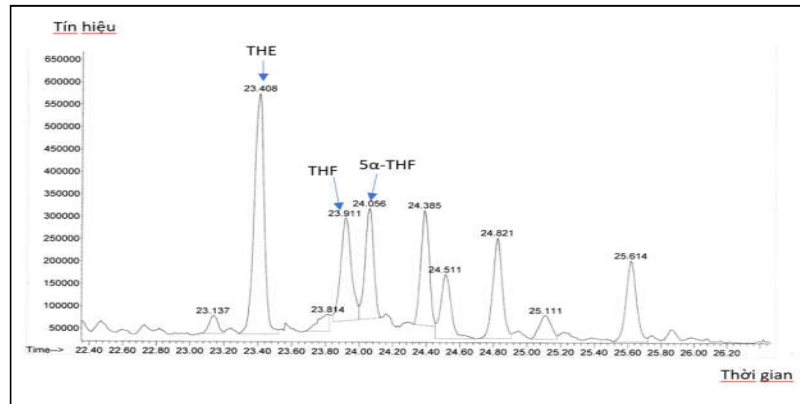
Dấu hiệu lâm sàng thường gặp là bộ phận sinh dục không rõ ràng, không phân biệt được nam và nữ khiến một số trẻ được cho là nữ khi sinh. Các người bệnh còn lại đều có dương vật nhỏ hơn nhiều so với tuổi, bìu chẻ đôi, lỗ đái thấp ở góc dương vật. 2/14 người bệnh có dấu hiệu ỉn tinh hoàn một bên. Trong đó hai cặp anh em ruột trong hai gia đình (VD13 và VD14), (VD15 và VD16). 10 người bệnh còn lại trong gia đình có chị hoặc em gái không có bất thường về rối loạn phát triển giới tính. Các dấu hiệu dậy thì chưa xuất hiện ở hai người bệnh > 12 tuổi. Hình ảnh người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 được trình bày trong phụ lục 7 (hình 7 và 8).



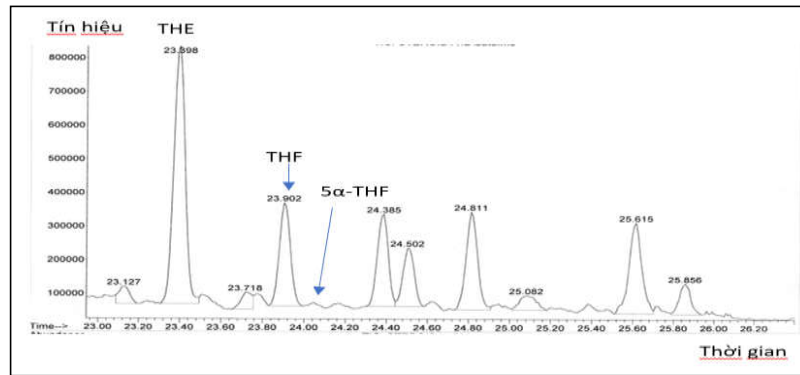
Biểu đồ 3.22. Sắc ký đồ toàn thể mẫu thiếu 5 α -reductase type 2

Sắc ký đồ người bệnh nam 10,5 tuổi, đỉnh THF rất rõ trong khi 5 α -THF rất thấp, không thấy rõ trên sắc ký đồ, không có các đỉnh 17OHPN, PTL, THS.

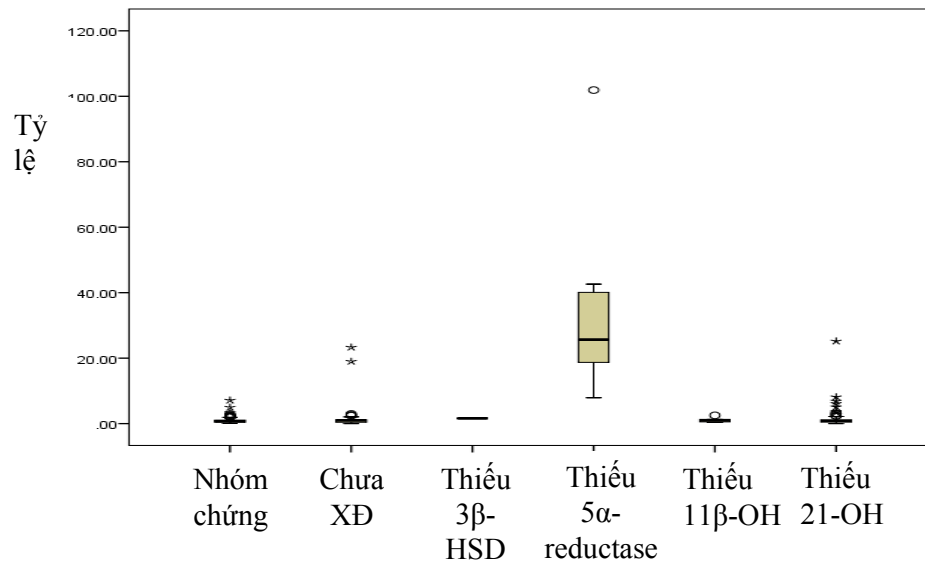
Ở mẫu bình thường hai đỉnh THF và 5 α -THF rất rõ, ít chênh lệch về cường độ tín hiệu (hình 3.23). Mẫu thiếu enzym 5 α -reductase type 2 có đỉnh THF rất rõ, đỉnh 5 α -THF hầu như không phát hiện trên sắc ký đồ (hình 3.24).



Biểu đồ 3.23. Sắc ký đồ mẫu bình thường



Biểu đồ 3.24. Sắc ký đồ mẫu thiếu 5α-reductase type 2



Biểu đồ 3.25. Tỷ lệ THF/5α-THF ở các nhóm

Tỷ lệ THF/5α-THF cao ở nhóm thiếu enzym 5α-reductase type 2.

Bảng 3.27. Giá trị chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 của một số tỷ lệ

<i>Tỷ lệ chẩn đoán</i>	<i>THF/ 5α-THF</i>	<i>5αTHF/ THF</i>	<i>Et/An</i>	<i>An/Et</i>
Điểm cắt tối ưu	1,39			3,49
Diện tích dưới đường cong (AUC)	0,579	0,418	0,506	0,546
Độ nhạy	0,270			0,215
Độ đặc hiệu	0,911			0,912
Giá trị chẩn đoán dương tính	0,692			0,694
Giá trị chẩn đoán âm tính	0,627			0,556

Diện tích dưới đường cong của các tỷ lệ chẩn đoán <0,6 nên giá trị chẩn đoán thấp. Giá trị chẩn đoán của tỷ lệ THF/5 α -THF và An/Et ở người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 tốt hơn so với tỷ lệ 5 α THF/THF và Et/An do xác định được điểm cắt, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị chẩn đoán dương tính và âm tính.

14/14 người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 có tỷ lệ THF/5 α -THF cao hơn so với điểm cắt 1,39. Điểm cắt này, độ đặc hiệu đạt 91,1% giúp chẩn đoán xác định thiếu 5 α -reductase type 2 ở người bệnh mắc rối loạn phát triển giới tính nghi ngờ mắc thiếu enzym 5 α -reductase type 2.

3.3.5. Thiếu 3 β -HSD II

Có 1 người bệnh nghi mắc thiếu enzym 3 β -HSD II do tỷ lệ DHEA/ (THE +THF +5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu trong khi tỷ lệ chẩn đoán khác trong giới hạn bình thường. Người bệnh là nam, 27 tuổi, người dân tộc H'mông được chẩn đoán rối loạn phát triển giới tính ở người mang nhiễm sắc thể 46,XY. Định lượng steroid niệu bằng GC/MS khi chưa điều trị, kết quả như sau:

Bảng 3.28. Kết quả steroid niệu ở người bệnh nghi thiếu 3 β -HSD II

STT	Steroid niệu	Nồng độ steroid ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)		So với khoảng tham chiếu
		Người bệnh	Tham chiếu ở nam 8- \leq 11 tuổi	
1	An	0,73	0,01– 0,38	Cao
2	Et	0,65	0 – 0,29	Cao
3	DHEA	8,6	0,01 – 0,22	Rất cao
4	11 Keto-An	0,26	0,01 – 0,39	Bình thường
5	11OH-An	0,78	0,01 – 0,52	Cao
6	11OH Et	0,17	0 – 0,13	Cao
7	PD	0,08	0 – 0,12	Bình thường
8	PT	0,12	0-0,16	Bình thường
9	A'3	0,06	0 – 0,15	Bình thường
10	THE	1,69	0,17 – 5,08	Bình thường
11	THF	1,03	0,02 – 1,11	Bình thường
12	5 α -THF	0,65	0,03 – 1,51	Bình thường
13	α -Cortolone	0,54	0,03 – 1,37	Bình thường
14	β -Cortol	0,02	0,02 – 0,27	Bình thường
15	β -Cortolone	0,20	0,06 – 0,64	Bình thường
16	α -Cortol	0,20	0,01– 0,18	Bình thường
17	THS	0,01	0 –0,03	Bình thường

Nồng độ An, Et, 11-OH An, 11-OH Et của người bệnh cao hơn so với trẻ nam từ 8-11 tuổi. Nồng độ DHEA rất cao so với trẻ 8 - \leq 11 tuổi cao hơn giới hạn trên 39 lần. Nồng độ PT, THS trong giới hạn bình thường.

Bảng 3.29. Tỷ lệ chẩn đoán ở người bệnh thiếu 3 β -HSD II

<i>Tỷ lệ chẩn đoán</i>	<i>Người bệnh</i>	<i>Khoảng tham chiếu</i>	<i>So với khoảng tham chiếu</i>
PT/ (THE +THF +5 α -THF)	0,034	0,01-0,06	Bình thường
THS/ (THE +THF +5 α -THF)	0,002	0-0,10	Bình thường
THF/5 α -THF	1,60	0,38-3,31	Bình thường
An/Et	1,13	0,95-2,89	Bình thường
DHEA/ (THE +THF +5 α -THF)	2,55	0-0,17	Rất cao

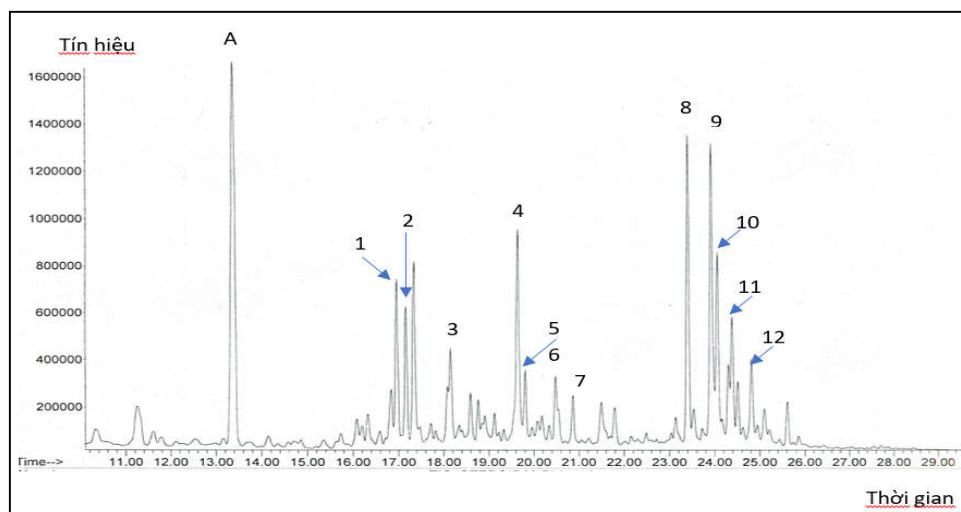
Tỷ lệ DHEA/ (THE +THF +5 α -THF) cao hơn giới hạn trên của khoảng tham chiếu 15 lần trong khi các tỷ lệ khác trong giới hạn bình thường.

Không có dấu hiệu thiếu 21-OH, 11 β -OH hoặc thiếu 5 α -reductase type 2 trên kết quả định lượng steroid niệu.

Bảng 3.30. Nồng độ các hormon ở người bệnh nghi thiếu 3 β -HSD II

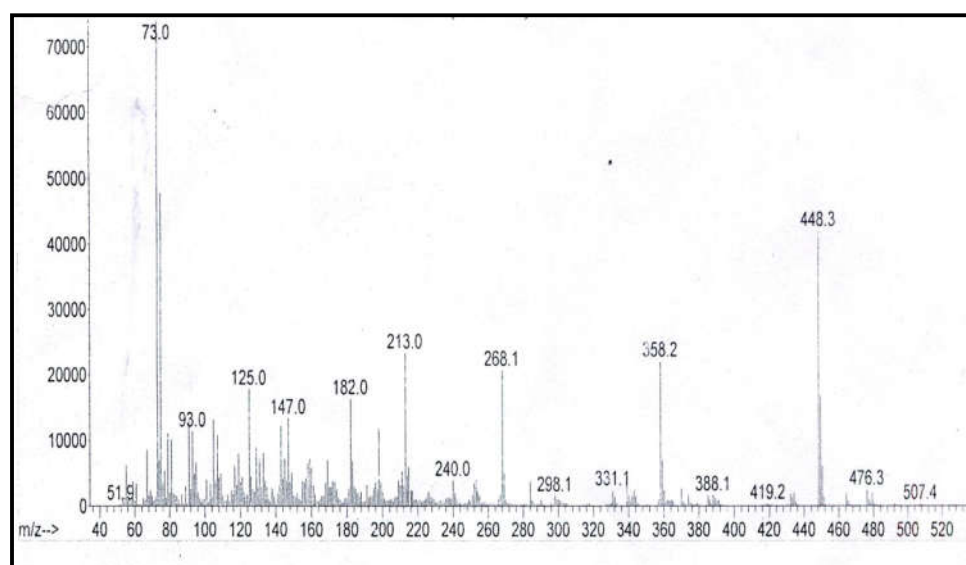
<i>Xét nghiệm</i>	<i>Kết quả người bệnh</i>	<i>Khoảng tham chiếu</i>	<i>Kết luận</i>
LH	29,38	1,7-8,6 (mIU/mL)	Cao
FSH	54,39	1,5-12,4 (mIU/mL)	Cao
Testosterone	14,99	8,64-29,0 (nmol/L)	Bình thường
17-OHP	0,9	0,5-2,1 (ng/mL)	Bình thường
Androstenedione	11,6	0,6-2,7 (ng/mL)	Cao

Nồng độ 17-OHP và testosterone của người bệnh trong giới hạn bình thường trong khi nồng độ androstenedione, FSH, LH cao.



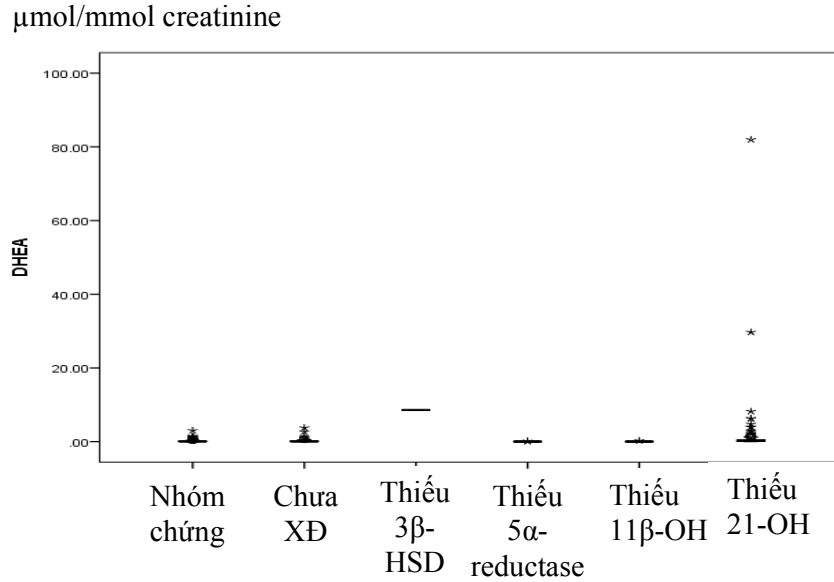
Biểu đồ 3.26. Sắc ký đồ mẫu thiếu 3 β -HSD II

Chuẩn nội A, đỉnh An (1), Et (2), **DHEA (3)**, 11 OH An (4), 11OH Et (6), PT (7), THE (8), THF (9), 5 α -THF (10), α -Cortolone (11), β -Cortol (12).



Biểu đồ 3.27. Mẫu ion đặc hiệu cho DHEA

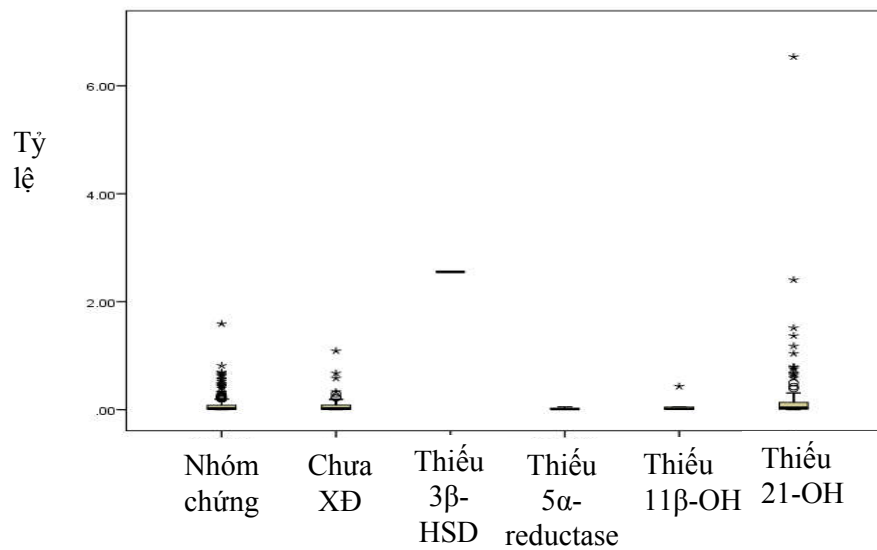
DHEA có các mảnh ion đặc trưng 268, 358, 448 (m/z), thời gian lưu 18,2 phút. Tăng nồng độ DHEA là dấu hiệu của thiếu 3 β -HSD II trong khi không xuất hiện đỉnh 17OHPN, PTL, THS.



Biểu đồ 3.28. So sánh nồng độ DHEA giữa các nhóm

Nồng độ DHEA ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$) cao ở người bệnh thiếu 3 β -HSD II và một số người bệnh thiếu 21-OH. Cá biệt có một người bệnh thiếu 21-OH có nồng độ DHEA rất cao so với các người bệnh khác.

Tỷ lệ DHEA/(THE + THF + 5 α -THF)



Biểu đồ 3.29. So sánh tỷ lệ DHEA/(THE+THF+5 α -THF) giữa các nhóm

Tỷ lệ DHEA/(THE + THF + 5 α -THF) cao ở người bệnh thiếu 3 β -HSD II và một số người bệnh thiếu 21-OH.

3.3.6. Đặc điểm nhóm đã điều trị

TSTTBS là bệnh lý có thể gây suy thượng thận, cần điều trị cấp cứu ngay khi người bệnh có dấu hiệu rối loạn nước điện giải, hôn mê. Nhiều người bệnh nghi mắc TSTTBS được điều trị hydrocortisone ngay khi vào viện, trước khi lấy mẫu. Chẩn đoán xác định nguyên nhân gây TSTTBS cho những trường hợp đã điều trị là cần thiết. Trong số 84 người bệnh đã được điều trị có 69 người bệnh thiếu 21-OH, 2 người bệnh thiếu 11 β -OH và 13 người bệnh chưa xác định được rối loạn tổng hợp hormon steroid.

Bảng 3.31. Đặc điểm người bệnh thiếu 21-OH đã điều trị

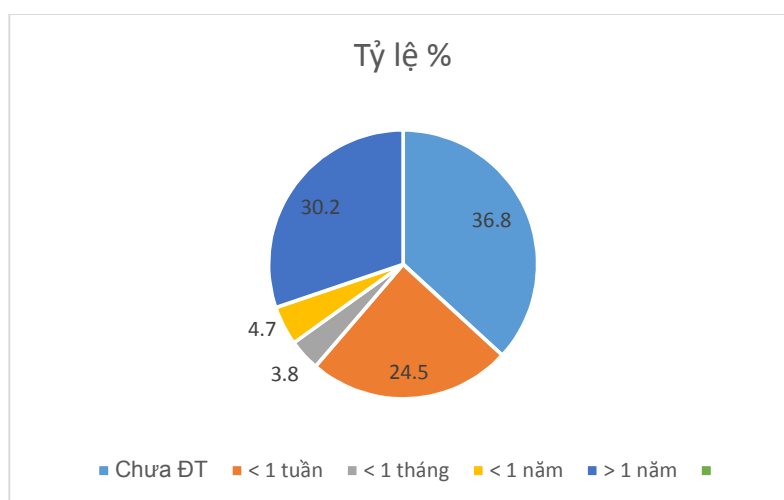
<i>Tuổi</i>	<i>Nam</i>	<i>Nữ</i>	<i>Tổng số n (%)</i>
≤ 28 ngày	8	8	16 (23,19%)
1 tháng - <2 tuổi	11	8	19 (27,54%)
2 - < 8 tuổi	4	10	13 18,84%)
8- ≤ 11 tuổi	4	2	6 (8,70%)
> 11 tuổi	4	10	14 (20,29%)
Tổng số	31	38	69 (100%)

69 người bệnh thiếu 21-OH định lượng steroid niệu được phát hiện khi đã điều trị hydrocortisone từ 1 ngày đến nhiều năm trong đó nam là 31/69 chiếm 44,93%, nữ là 38/69 chiếm 55,07%. Những bệnh nhân có dấu hiệu lâm sàng của TSTTBS nhưng chưa được chẩn đoán xác định nguyên nhân gây TSTTBS, được định lượng steroid niệu nhằm xác định nguyên nhân, trong đó 69 người bệnh thiếu 21-OH phân bố nhiều độ tuổi từ sơ sinh đến >11 tuổi.

Bảng 3.32. Steroid niệu ở người bệnh thiếu 21-OH đã điều trị

Thông số	PT ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	PT/(THE + THF + 5 α -THF)	DHEA/(THE + THF+5 α -THF)
n	69	69	69
Min	0,044	0,01	0,0
Max	416,01	38,44	2,41
Trung vị	4,72	0,51	0,03
Trung bình	15,30	2,88	0,18
Số BN có kết quả bình thường	1	11	61

Ở người bệnh thiếu 21-OH đã điều trị, nồng độ PT cao gặp ở 98,6% người bệnh. Tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) cao ở 84,6% người bệnh. Tỷ lệ DHEA/(THE + THF + 5 α -THF) cao gặp ở 11,6% người bệnh ở nhóm 3 và 4.

**Biểu đồ 3.30. Thời điểm lấy mẫu của người bệnh thiếu 21-OH**

Trong số 106 người bệnh thiếu 21-OH được phát hiện bằng định lượng steroid niệu, chỉ có 36,8% người bệnh được lấy mẫu trước khi điều trị hydrocortisone, 24,5% được lấy mẫu trong tuần đầu điều trị, 30,2% người bệnh đã điều trị trên 1 năm, được chẩn đoán TSTTBS nhưng chưa được chẩn đoán nguyên nhân thiếu hụt enzym gây TSTTBS.

Bảng 3.33. So sánh steroid niệu ở nhóm thiếu 21-OH đã điều trị

Số TT	Steroid niệu	Trung vị (min, max)		p*
		Đơn vị $\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$		
		Nhóm chứng (n=269)	Đã điều trị (n=69)	
1	An	0,02 (0,0 – 1,08)	0,18 (0,0-29,7)	0,000
2	Et	0,015 (0,0 – 0,71)	0,09 (0,0-17,2)	0,000
3	DHEA	0,048 (0,0 – 3,03)	0,17 (0,0-81,9)	0,000
4	11 Keto-An	0,045 (0,0 – 1,32)	0,26 (0,0-19,6)	0,000
5	11OH-An	0,056 (0,0 – 1,05)	0,88 (0,0-57,3)	0,000
6	11OH Et	0,015 (0,0 – 0,71)	0,05 (0,0-3,85)	0,000
7	PD	0,036 (0,0 – 1,33)	0,31 (0,0-12,1)	0,000
8	PT	0,048 (0,0 – 1,03)	4,72 (0,13-416,0)	0,000
9	A'3	0,057 (0,0 – 123,6)	0,11 (0,0-21,2)	0,200
10	THE	1,39 (0,02 – 22,14)	3,52 (0,04-88,4)	0,000
11	THF	0,35 (0,01 – 5,24)	0,74 (0,0-92,7)	0,000
12	5 α -THF	0,53 (0,01 – 15,73)	1,05 (0,02-64,5)	0,000
13	α -Cortolone	0,069 (0,0 – 4,04)	0,53 (0,02-4,09)	0,000
14	β -Cortol	0,082 (0,0 – 3,90)	0,22 (0,0-8,85)	0,000
15	β -Cortolone	0,27 (0,0 – 12,32)	0,68 (0,01-21,6)	0,000
16	α -Cortol	0,25 (0,0 – 16,06)	0,11 (0,01-3,41)	0,017
17	THS	0,007 (0,0 – 0,71)	0,02 (0,0-3,45)	0,107

*Kiểm định Mann-Whitney cho phân bố không theo quy luật chuẩn.

Nồng độ An, Et, 11OH An, 11OH Et, PT ở người bệnh sau điều trị cao hơn nhóm chứng $p < 0,001$. Nồng độ THE, THF, 5 α -THF, cortolone và cortol cao hơn so với nhóm chứng $p < 0,05$. Riêng A'3 và THS không khác biệt so với nhóm chứng $p > 0,05$.

Thiếu 11β -OH đã điều trị: có 2 người bệnh được chẩn đoán TSTTBS đã điều trị hydrocortisone được 5 tháng và 17 năm, khi định lượng steroid niệu thấy tỷ lệ THS/ (THE +THF + 5α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu được chẩn đoán thiếu 11β -OH. 1/2 người bệnh có tỷ lệ DHEA/(THE +THF + 5α -THF) và tỷ lệ PT/ (THE +THF + 5α -THF) cao hơn tham chiếu nhưng không có đỉnh 17OHPN, PTL.

Về lâm sàng, người bệnh thiếu 11β -OH có dấu hiệu dậy thì sớm tương tự như người bệnh thiếu 21-OH, đồng thời có thể xuất hiện triệu chứng tăng huyết áp khi còn rất trẻ 3-5 tuổi mà không gặp ở người bệnh thiếu 21-OH.

Toàn bộ người bệnh thiếu 5α -reductase type 2, thiếu 3β -HSD II được lấy mẫu định lượng steroid niệu bằng GC/MS trước khi điều trị hormon thay thế.

3.3.7. Đặc điểm nhóm chưa xác định

74 người bệnh không phát hiện mẫu hình đặc trưng cho các nguyên nhân gây rối loạn tổng hợp hormon steroid. Một số người bệnh rối loạn phát triển giới tính do bất thường nhiễm sắc thể: một trường hợp có NST 45,XO với triệu chứng có một tinh hoàn và bìu, lỗ đái thấp. Một người bệnh mang nhiễm sắc thể chuyển đoạn hòa nhập tâm giữa NST 13 và NST 14 tạo ra nhiễm sắc thể bất thường và bộ NST 45, XY rob(13,14) có triệu chứng vú to ở người nam.

Một người bệnh là nữ (NST 46,XX) không có âm đạo và một người bệnh là nam (NST 46,XY) không có dương vật.

Hai người bệnh bất thường thời kỳ biệt hóa giới tính của bào thai: ngoại hình nam, có dương vật, tinh hoàn một bên và buồng trứng vòi trứng, tử cung bên còn lại trên cùng cơ thể.

Một số người bệnh ngoại hình nữ, nhiễm sắc thể 46,XY có dấu hiệu vô kinh tiên phát, có tinh hoàn 2 bên, không có tử cung và buồng trứng nghi do không nhạy cảm hoàn toàn với androgen.

Bảng 3.34. Đặc điểm steroid niệu nhóm chưa xác định

Số TT	Steroid niệu	Trung vị (min, max) Đơn vị $\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$		p*
		Nhóm chứng (n=269)	Chưa xác định (n=74)	
1	An	0,02 (0,0 – 1,08)	0,03 (0,0-0,70)	0,003
2	Et	0,015 (0,0 – 0,71)	0,025 (0,0-0,88)	0,002
3	DHEA	0,048 (0,0 – 3,03)	0,046 (0,0-3,77)	0,872
4	11 Keto-An	0,045 (0,0 – 1,32)	0,05 (0,0-1,12)	0,279
5	11OH-An	0,056 (0,0 – 1,05)	0,05 (0,0-0,95)	0,972
6	11OH Et	0,015 (0,0 – 0,71)	0,014 (0,0-1,91)	0,280
7	PD	0,036 (0,0 – 1,33)	0,043 (0,01-2,49)	0,041
8	PT	0,048 (0,0 – 1,03)	0,085 (0,01-0,48)	0,002
9	A'3	0,057 (0,0 – 123,6)	0,078 (0,0-78,77)	0,449
10	THE	1,39 (0,02 – 22,14)	1,33 (0,03-55,1)	0,887
11	THF	0,35 (0,01 – 5,24)	0,33 (0,0-14,94)	0,587
12	5 α -THF	0,53 (0,01 – 15,73)	0,43 (0,0-10,54)	0,618
13	α -Cortolone	0,069 (0,0 – 4,04)	0,25 (0,01-4,27)	0,000
14	β -Cortol	0,082 (0,0 – 3,90)	0,09(0,0-2,57)	0,014
15	β -Cortolone	0,27 (0,0 – 12,32)	0,33 (0,01-9,6)	0,136
16	α -Cortol	0,25 (0,0 – 16,06)	0,064 (0,0-1,15)	0,000
17	THS	0,007 (0,0 – 0,71)	0,026 (0,0-0,43)	0,000

*Kiểm định Mann-Withney dành cho thông số phân bố không chuẩn.

Nhiều steroid niệu không khác biệt giữa nhóm chưa xác định với nhóm chứng như DHEA, 11keto An, 11OH An, A,3, THE, THF 5 α -THF ($p>0,05$). Không có dấu hiệu đầy đủ, đặc trưng cho các thể bệnh TSTTBS như thiếu 21-OH, thiếu 11 β -OH, thiếu 3 β -HSD II hay thiếu 5 α -reductase type 2.

Chương 4

BÀN LUẬN

Phân tích steroid niệu bằng sắc ký khí khối phổ được xem như một công cụ quan trọng trong chẩn đoán các rối loạn sinh tổng hợp và chuyển hóa hormon steroid bẩm sinh hoặc mắc phải được ứng dụng trên thế giới từ hơn 35 năm qua. Tại Việt Nam, nhu cầu chẩn đoán và theo dõi điều trị cho người bệnh mắc rối loạn tổng hợp steroid là rất lớn. Với các trang thiết bị hiện có tại phòng xét nghiệm, định lượng steroid niệu bằng GC/MS được triển khai dựa theo phương pháp của Honour JW [18]. Các steroid niệu được thủy phân nhờ enzym glucuronidase và sulphatase, tách chiết rồi tạo dẫn xuất với methoxyamin và TMSI, phân tách và định lượng các steroid trên máy GC/MS. Rất nhiều sản phẩm chuyển hóa của hormon steroid và tiền chất trong nước tiểu được phát hiện, đến nay có hơn 100 sản phẩm được công bố. Tuy nhiên, chỉ có một số sản phẩm chuyển hóa quan trọng cần được định lượng nhằm chẩn đoán các nhóm bệnh lý rối loạn chuyển hóa steroid riêng biệt. Phương pháp sử dụng chuẩn steroid niệu đông khô của SKLM (Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratorium diagnostiek). Phổ khối toàn phần (full mass spectra) được sử dụng để xác định cấu trúc của các steroid cần phân tích. Các nhóm ion đặc trưng được lựa chọn theo phương pháp SIM (selected ion monitoring) gồm 2 ion đại diện từ phổ khối, sử dụng phần mềm của máy khối phổ cho mỗi chất phân tích. Phân tích định lượng dựa trên cường độ các ion chọn lọc của chất phân tích và được hiệu chuẩn nhờ tín hiệu của chuẩn nội. Để khẳng định kết quả có thể so sánh được với các phòng xét nghiệm khác trên thế giới, chúng tôi tham gia vào chương trình ngoại kiểm steroid niệu của University College London (UCL)/SKML. Quá trình triển khai kỹ thuật tuân theo các hướng dẫn quốc tế về thẩm định phương pháp và thiết lập khoảng tham chiếu cũng như áp

dụng các tiêu chuẩn chẩn đoán của các tác giả trên thế giới trong chẩn đoán bệnh rối loạn tổng hợp hormon steroid bẩm sinh tại Việt Nam.

Kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS lần đầu tiên được ứng dụng ở Việt Nam nên chưa có phòng xét nghiệm tham chiếu và bản thân kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS đã là tiêu chuẩn vàng nên không so sánh với các kỹ thuật xét nghiệm khác hiện đang có tại Việt Nam. Việc thẩm định bao gồm các thực nghiệm xác định độ lặp và tái lặp, giới hạn định lượng, độ thu hồi, so sánh kết quả với các phòng xét nghiệm khác tham gia trong chương trình ngoại kiểm. Khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ ≤ 11 tuổi được xây dựng sau khi phương pháp được thẩm định cho thấy đáp ứng tiêu chuẩn chất lượng. Từ kết quả tham chiếu xây dựng được áp dụng trong nhận định kết quả định lượng steroid niệu ở người bệnh nghi mắc rối loạn sinh tổng hợp steroid như TSTTBS và RLPTGT để chẩn đoán xác định, chẩn đoán thể TSTTBS.

4.1. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng steroid niệu bằng GC/MS

Các thông số steroid niệu được định lượng gồm 16 sản phẩm chuyển hóa quan trọng của steroid niệu và 1 sản phẩm được bán định lượng là THS do chất chuẩn đang sử dụng không có THS. Vì THS là sản phẩm chuyển hóa quan trọng giúp chẩn đoán thiếu enzym 11β -OH nên rất cần được định lượng hoặc bán định lượng. Chúng tôi sử dụng steroid tinh khiết, tự pha để thiết lập đường chuẩn nhằm bán định lượng THS cho các mẫu chứng và mẫu bệnh.

Giới hạn định lượng của các steroid niệu là rất tốt với 14/16 steroid có giới hạn định lượng $\leq 0,16 \mu\text{mol/L}$ (bảng 3.1), cho phép định lượng chính xác các steroid niệu ngay cả với mẫu nước tiểu loãng. Độ thu hồi tương đối của các sản phẩm chuyển hóa steroid niệu trong khoảng 90-115 (%) tương ứng với giá trị trung bình \pm SD là $104,1 \pm 9,25$ (%). Độ thu hồi phần nào thể hiện được kỹ thuật được thực hiện tốt, đảm bảo kết quả cho người bệnh. Tác giả Homma K khi tiến hành xây dựng giá trị tham chiếu cho trẻ sơ sinh tại Nhật Bản công bố

công bố tỷ lệ thu hồi các sản phẩm steroid niệu là 103 ± 12 (%) tương tự kết quả của chúng tôi [119]. Theo Honour JW, độ thu hồi của các sản phẩm chuyển hóa steroid niệu khoảng 90% tùy thuộc từng sản phẩm [18]. Như vậy, kết quả nghiên cứu trong đề tài này đáp ứng được các tiêu chuẩn cho phép và tương ứng với các nghiên cứu của các tác giả khác.

Để đánh giá sai số ngẫu nhiên của xét nghiệm định lượng steroid niệu bằng GC/MS, độ lặp và tái lặp của hai mẫu nước tiểu trộn bình thường và bệnh lý được xác định. Độ lặp và tái lặp trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự với các nghiên cứu của tác giả khác trên thế giới như Homma K, Caulfield MP và cộng sự [7],[119]. Một số sản phẩm chuyển hóa của steroid niệu quan trọng trong chẩn đoán rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid như PT, THE, THF, 5 α -THF có độ lặp và độ tái lặp rất tốt trong đó độ lặp có CV < 10% và độ tái lặp có CV < 20%. Đặc biệt với PT có CV nhỏ, PT là steroid niệu đặc biệt quan trọng trong chẩn đoán thiếu enzym 21-OH. Nghiên cứu của Homma K và cộng sự công bố độ lặp có CV 4-8 (%), độ tái lặp 11 ± 6 (%) tương tự nghiên cứu của chúng tôi [119]. Độ lặp trong nghiên cứu Chan OK công bố có CV 1,3-11,9 (%), độ tái lặp cho các sản phẩm steroid niệu 1,3-13,3 (%) cao hơn trong nghiên cứu của chúng tôi [8]. Theo Honour JW, độ lặp lại và độ tái lặp của các steroid niệu <25% là chấp nhận được [18], như vậy kết quả của chúng tôi hoàn toàn được chấp nhận và kỹ thuật là đảm bảo độ chính xác, máy hoạt động ổn định và mẫu ổn định theo thời gian.

Trong quá trình thực hiện xét nghiệm định lượng steroid niệu, bên cạnh việc thực hiện cho mẫu nội kiểm tự chuẩn bị ở mức bình thường và mức bệnh lý đồng thời với mẫu của người bệnh, chúng tôi tham gia chương trình ngoại kiểm steroid niệu của SKML. Chương trình có sự tham gia của 28 phòng xét nghiệm trên thế giới. Mỗi tháng thực hiện một mẫu ngoại kiểm tương tự như mẫu bệnh và gửi kết quả về trung tâm để so sánh với các phòng xét nghiệm

khác. Độ chính xác (accuracy) của phương pháp được đánh giá bằng so sánh kết quả của phòng xét nghiệm với trung vị của tất cả các phòng xét nghiệm tham gia ngoại kiểm. Mối tương quan giữa chặt chẽ giữa kết quả của phòng xét nghiệm thể hiện qua hệ số tương quan r đạt từ 0,970 đến 0,999 (bảng 3.4, biểu đồ 3.2 và 3.3). Phương trình tương quan được thiết lập dưới dạng $y = ax + b$, với hệ số a xung quanh giá trị 1.0 và hệ số b xung quanh giá trị 0 ở 13/16 sản phẩm steroid niệu. Tuy vậy, còn 3 steroid niệu có hệ số a khác 1,0 là 11OH Et ($a=0,611$), DHEA ($a=1,25$), THE ($a=1,25$) nên có xu hướng kết quả 11OH Et thấp hơn kết quả trung vị của ngoại kiểm và DHEA, THE có xu hướng cao hơn giá trị trung vị của kết quả ngoại kiểm. Để đánh giá sự khác biệt giữa kết quả của phòng xét nghiệm với giá trị trung vị của ngoại kiểm, phân tích bằng biểu đồ Bland Alman (còn gọi là biểu đồ khác biệt: difference plot) cho toàn bộ các steroid trong đó có các steroid THE, 11OH-Et, DHEA. Kết quả phân tích sự khác biệt cho thấy các steroid niệu tương đồng tốt với ngoại kiểm (biểu đồ 3.4 và 3.5). Việc so sánh phương pháp, đánh giá sự tương đồng giữa hai phương pháp hoặc giữa các phòng xét nghiệm là rất quan trọng, cho phép thông báo kết quả của phương pháp mới hay của phòng xét nghiệm là tương đương với phương pháp được so sánh hay với các phòng xét nghiệm được so sánh hay không [120].

Thực hiện ngoại kiểm steroid niệu giúp so sánh kết quả phòng xét nghiệm với các phòng xét nghiệm khác trên thế giới, có vai trò thực sự quan trọng và cần thiết với các phòng xét nghiệm [24].

4.2. Khoảng tham chiếu các sản phẩm steroid niệu ở trẻ em

Khoảng tham chiếu là đặc tính cuối cùng được đánh giá trong quá trình thẩm định phương pháp vì khoảng tham chiếu không phải là yếu tố quyết định hiệu năng của phương pháp có chấp nhận được hay không. Các thực nghiệm thẩm định kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS cho thấy kỹ thuật của chúng tôi có kết quả chính xác và xác thực, có thể sử dụng trong chẩn đoán các rối loạn sinh tổng hợp steroid. Kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS

lần đầu tiên được áp dụng tại khoa Hóa sinh – Bệnh viện Nhi Trung ương nên chưa có giá trị tham chiếu cho người Việt Nam. Thiết lập khoảng tham chiếu để hỗ trợ cho việc diễn giải kết quả xét nghiệm của người bệnh. Hơn nữa do đặc điểm riêng của người bệnh tại phòng xét nghiệm của chúng tôi phần lớn là bệnh nhi nên cần thiết lập khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ em từ sơ sinh đến 11 tuổi đáp ứng cho phần lớn nhóm bệnh đến khám và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương.

Đối tượng tham chiếu bao gồm 269 trẻ khỏe mạnh gồm 137 nam và 132 nữ, từ sơ sinh đến ≤ 11 tuổi, được chia làm 4 nhóm (số lượng nam và nữ không có sự khác biệt $p > 0,05$). Số lượng mỗi nhóm trong nghiên cứu của chúng tôi đạt trên 60 mẫu, đủ cỡ mẫu tối thiểu theo yêu cầu thiết lập khoảng tham chiếu theo CLSI EP28A-C3 [25] và cao hơn một số nghiên cứu khác công bố trên thế giới của Caulfield MP và cộng sự [7], Homma K và cộng sự [119], Nasser AD và cộng sự [26].

Sự phân bố của số liệu tham chiếu: 17 thông số định lượng steroid niệu và các tỷ lệ chẩn đoán quan trọng đều phân bố không theo quy luật chuẩn, có sự khác biệt giữa giá trị trung bình (mean) và giá trị trung vị (median) được thể hiện rõ trong biểu đồ 3.6. Vì số liệu không tuân theo quy luật phân bố chuẩn nên thống kê theo phương pháp phi tham số được áp dụng. Tất cả các số liệu được sắp xếp theo trật tự tăng dần và x là thứ tự quan sát (số nhỏ nhất có $x = 1$; lớn nhất có $x = n$). Giới hạn dưới của khoảng tham chiếu là $x_{0,025}$ (2.5th percentile) tương ứng với $0,025(n+1)$ và giới hạn trên của khoảng tham chiếu là $x_{0,975}$ (97.5th percentile) tương ứng với $0,975(n+1)$.

Trong nghiên cứu này, mẫu nước tiểu sử dụng là mẫu ngẫu nhiên tương tự nghiên cứu của Lucas-Herald AK, Nasser AD, Homma K rất phù hợp với trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ vì dễ lấy mẫu [27],[26],[119]. Để chẩn đoán rối loạn tổng hợp steroid cho người trưởng thành thường sử dụng mẫu nước tiểu 24h nhằm bảo

đảm kết quả tốt hơn. Tuy vậy, việc thu thập nước tiểu 24h đúng, đủ là đặc biệt khó ở trẻ em và tốn thời gian, bất tiện cho người bệnh và nhân viên y tế, do vậy chúng tôi sử dụng nước tiểu ngẫu nhiên. Nước tiểu ngẫu nhiên có thể thu thập dễ dàng và có bằng chứng cho thấy có thể thay thế nước tiểu 24h. Khi sử dụng nước tiểu ngẫu nhiên, kết quả chất phân tích cần được hiệu chỉnh nhờ creatinine-chất được bài tiết với tỷ lệ hằng định trong nước tiểu để điều chỉnh sự khác biệt về mức độ pha loãng của nước tiểu. Do vậy, creatinine niệu được định lượng nhằm hiệu chỉnh nồng độ chất phân tích về đơn vị $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine. Các sản phẩm steroid niệu được báo cáo dưới dạng tỷ lệ trên nồng độ creatinine, tuy vậy chưa thống nhất một đơn vị quốc tế cho kết quả steroid niệu. Một số tác giả trên thế giới sử dụng các đơn vị khác nhau cho xét nghiệm định lượng steroid niệu như đơn vị $\mu\text{mol}/\text{L}$ [121], đơn vị $\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinine [7], đơn vị mg/g creatinine [12], $\mu\text{g}/\text{mmol}$ creatinine [26], $\mu\text{mol}/24\text{h}$ với mẫu nước tiểu 24 giờ vì vậy, có khó khăn khi so sánh giữa khoảng tham chiếu của các tác giả.

Khi phân tích giá trị thu được từ định lượng steroid niệu cho 269 trẻ bình thường từ sơ sinh đến ≤ 11 tuổi, chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt nồng độ steroid niệu rất có ý nghĩa thống kê theo tuổi với $p \leq 0,001$ (bảng 3.6) giữa 4 nhóm trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ < 2 tuổi, trẻ 2-8 tuổi và trẻ lớn bắt đầu dậy thì 8-11 tuổi. Homma K, Caulfield MP đã thiết lập khoảng tham chiếu cho trẻ sơ sinh [7],[119]. Nasser AD thiết lập khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ các tuần tuổi khác nhau trong năm đầu tiên của trẻ [26], tác giả thấy rằng các sản phẩm steroid niệu có nguồn gốc từ thượng thận thai nhi còn tồn tại sau khi sinh, đạt đỉnh tuần thứ 3 và giảm dần theo thời gian. Từ năm 1989, Weykamp CW và cộng sự đã công bố giá trị tham chiếu cho 13 sản phẩm steroid niệu theo đơn vị ($\mu\text{mol}/\text{L}$) như An, Et, DHEA, 11 keto An, 11OH An, 11OH Et, PD, PT, THE, THF, 5 α -THF tương tự như chúng tôi cùng các tỷ lệ Et/An, THE/THF, THF/5 α -THF cho trẻ em trong đó có độ tuổi đến 11 tuổi [121]. Tuy nhiên, vì đối tượng

người bệnh đến với chúng tôi phần lớn là trẻ nhỏ tại Bệnh viện Nhi nên trước hết chúng tôi xây dựng khoảng tham chiếu cho trẻ em ≤ 11 tuổi.

Sự biến đổi nồng độ các steroid theo nhóm tuổi được thể hiện rõ trong các biểu đồ từ 3.7 đến 3.10. Nồng độ An và Et thấp ở 3 nhóm trẻ < 8 tuổi, bắt đầu cao lên với trẻ > 8 tuổi. Nồng độ DHEA cao nhất ở trẻ sơ sinh do DHEA là sản phẩm steroid chủ yếu từ mẹ qua rau thai sang con [22]. DHEA thấp ở trẻ > 1 tháng tuổi. Nồng độ 11OH An chỉ tăng dần ở trẻ ≥ 8 tuổi và rất thấp ở trẻ dưới 8 tuổi. Nồng độ 11OH Et thấp ở các nhóm tuổi từ sơ sinh đến 12 tuổi. Nồng độ THE, THF, 5 α -THF có xu hướng tăng ở trẻ > 2 tuổi, đặc biệt là trẻ > 8 tuổi.

Khoảng tham chiếu cho nồng độ các steroid niệu

Chúng tôi mới chỉ xây dựng khoảng tham chiếu cho trẻ sơ sinh đủ cân và đủ tháng theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) và trẻ khỏe mạnh đến 11 tuổi để giúp chẩn đoán cho phần lớn trẻ mà chưa xây dựng khoảng tham chiếu cho trẻ sơ sinh nhẹ cân và thiếu tháng và trên 11 tuổi.

Steroid niệu của trẻ sơ sinh từ 1 ngày đến 28 ngày tuổi cho thấy 17/17 steroid niệu không có sự khác biệt giữa nam và nữ với $p > 0,05$. Ở trẻ sơ sinh, nồng độ DHEA và A³ cao hơn so với các steroid niệu còn lại. Sở dĩ nồng độ DHEA và A³ ở trẻ sơ sinh cao như vậy vì có sự trao đổi qua rau thai của DHEA từ mẹ sang con [22]. Các steroid niệu khác như An, Et, 11-OH An và 11 OH Et rất thấp. Nghiên cứu của Nasser AD và cộng sự chỉ ra rằng nồng độ của DHEA, PT, THS, 17OHPN, PT, PTL giảm dần trong những ngày đầu của trẻ và sau 30 ngày đã giảm rõ rệt. Xây dựng khoảng tham chiếu cho trẻ sơ sinh là cần thiết vì sau 1 tháng có sự khác biệt về nồng độ một số sản phẩm chuyển hóa steroid niệu [26].

Nồng độ steroid niệu có xu hướng giảm dần ở trẻ trên 1 tháng tuổi do các sản phẩm chuyển hóa steroid từ tuyến thượng thận thời kỳ bào thai và steroid từ mẹ truyền sang con qua rau thai giảm đi. Khoảng tham chiếu steroid niệu ở trẻ 1 tháng đến < 2 tuổi chỉ có PT là có sự khác biệt giữa nam và nữ (bảng 3.8).

Trong độ tuổi này, các sản phẩm chuyển hóa của androgen như An, Et rất thấp, nồng độ A³ và DHEA thấp hơn thời kỳ sơ sinh. Nồng độ THE cao hơn THF và 5 α -THF, nồng độ cortolone cao hơn cortol.

Nghiên cứu của Nasser AD và cộng sự cho thấy nồng độ các steroid niệu giảm đáng kể từ sau 1 tháng đến 6 tháng, đến tuần thứ 25 hầu hết các steroid chỉ còn khoảng 20% so với thời kỳ sơ sinh [26]. Mẫu nước tiểu của trẻ giai đoạn này thường rất loãng do trẻ dùng sữa nhiều, nên việc định lượng steroid niệu có thể gặp khó khăn, một số tác giả lựa chọn cách cô đặc nước tiểu bằng tách chiết lần 1 trước khi thủy phân cho một lượng nước tiểu tương ứng 75 μ g creatinine [7]. Tuy vậy, chúng tôi nhận thấy, kỹ thuật định lượng steroid niệu rất nhạy có thể định lượng chính xác đến khoảng 0,1 μ mol/L nên kết quả định lượng có thể được đảm bảo với phần lớn các steroid niệu trong mẫu nước tiểu có nồng độ creatinine niệu lớn hơn 0,5 mmol/L.

Nồng độ 17 sản phẩm chuyển hóa steroid niệu cho trẻ 2 - < 8 tuổi không có sự khác biệt giữa nam và nữ (bảng 3.9). Nồng độ các sản phẩm chuyển hóa của androgen An và Et, DHEA vẫn còn thấp, nồng độ các sản phẩm chuyển hóa của cortisol (THE, THF, 5 α -THF, α và β -cortolone, α và β -cortol) cao hơn các nhóm tuổi trước. Sau 2 tuổi, trẻ tham gia nhiều hoạt động hơn, tuyến thượng thận bài tiết nhiều hơn cortisol, aldosterone; trong khi nồng độ testosterone ở trẻ 2-8 tuổi còn thấp nên các sản phẩm chuyển hóa của testosterone như An và Et còn rất thấp.

Một số trẻ nữ ở độ tuổi 8-11 bắt đầu có dấu hiệu dậy thì và tăng các hormon sinh dục nữ trong khi đó ở trẻ nam dấu hiệu bắt đầu dậy thì thường muộn hơn 1-2 năm. Do vậy khoảng tham chiếu steroid niệu của trẻ 8- \leq 11 tuổi được thiết lập thấy nồng độ An và Et, 11OH-An tăng cao rõ rệt so với các nhóm < 8 tuổi (bảng 3.10). Nồng độ các sản phẩm chuyển hóa của cortisol cũng cao hơn trẻ 2-8 tuổi. Đặc biệt nhiều sản phẩm chuyển hóa steroid niệu như An, Et, 11Keto An, 11OH Et, PD, PT ở trẻ nữ cao hơn trẻ nam, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Độ tuổi bắt đầu dậy thì ở trẻ trai khoảng 10-12 tuổi, ở trẻ gái khoảng 9-11 tuổi theo nghiên cứu Nguyễn Thu Nhạn năm 1990 [122]. Tuy nhiên ngày nay do điều kiện kinh tế, xã hội phát triển, trẻ em có dấu hiệu dậy thì sớm hơn. Do vậy, có sự biến đổi theo hướng tăng dần nồng độ các sản phẩm chuyển hóa của androgen (An và Et, DHEA) và cortisol (THE, THF, 5α -THF) ở trẻ 8-11 tuổi, nồng độ steroid kể trên ở nữ cao hơn nam.

Khoảng tham chiếu có ý nghĩa rất quan trọng trong đánh giá sự thay đổi nồng độ steroid niệu ở người bệnh mắc TSTTBS, hay RLPTGT vì vậy khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ em khỏe mạnh ở các độ tuổi khác nhau giúp nhận định các trường hợp bất thường, xác định nguyên nhân gây rối loạn tổng hợp hormon steroid là đóng góp quan trọng của đề tài.

Khoảng tham chiếu cho các tỷ lệ chẩn đoán

Tỷ lệ chẩn đoán được sử dụng như một công cụ đặc hiệu giúp chẩn đoán thiếu hụt các enzym tham gia tổng hợp hormon steroid do có sự giảm nồng độ các sản phẩm chuyển hóa của hormon thành phẩm và tăng các sản phẩm chuyển hóa của tiền chất phía trước vị trí enzym bị thiếu. Với mỗi loại thiếu hụt enzym tham gia tổng hợp hormon steroid có một hoặc một số tỷ lệ chẩn đoán đặc hiệu (bảng 2.3). Dựa vào các nghiên cứu đã công bố trên thế giới chúng tôi thiết lập 8 tỷ lệ chẩn đoán quan trọng giúp chẩn đoán các bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid thường gặp. Các tỷ lệ này tương tự như tỷ lệ chẩn đoán được Krone N [7], Lucas-Herald AK [86] công bố giúp chẩn đoán thiếu 21-OH, 11 β -OH và Chan OK dùng trong chẩn đoán thiếu 5α -reductase type 2 [8],[64].

Sự phân bố số liệu của mỗi tỷ lệ chẩn đoán không theo quy luật chuẩn tương tự như với các thông số nồng độ steroid niệu vì vậy khoảng tham chiếu cho các tỷ lệ chẩn đoán được tính là 95% giá trị nằm trong khoảng từ phân vị 2,5 đến 97,5. Kết quả cho thấy các tỷ lệ chẩn đoán đều có sự khác biệt giữa các nhóm tuổi, nên khoảng tham chiếu được xây dựng riêng cho từng khoảng tuổi. Tỷ lệ 5α -THF/THF, THF/ 5α -THF, Et/An và An/Et được thiết lập riêng cho

nam giới nhằm chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 ở người bệnh mang nhiễm sắc thể 46,XY.

Tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) có sự khác biệt giữa nam và nữ ở trẻ sơ sinh và trẻ 8-11 tuổi. Trẻ sơ sinh nam, tỷ lệ này cao hơn nữ (giới hạn trên 0,19 với nam và 0,11 với nữ). Điều này có thể giải thích do trọng lượng cơ thể nam sơ sinh thường cao hơn nữ. Nồng độ PT trẻ sơ sinh phụ thuộc vào cân nặng của trẻ, trẻ nam có nồng độ PT cao hơn nữ nên tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) cao hơn nữ. Tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) ở nữ độ tuổi 8- \leq 11 cao hơn nam (giới hạn trên 0,15 so với 0,06) có thể do nữ trong độ tuổi này đã bắt đầu dậy thì và tăng tổng hợp hormon steroid trong đó nồng độ PT ở nữ có thể lên đến 0,24 μ mol/mmol creatinine trong khi nồng độ PT ở nam chỉ đến 0,16 μ mol/mmol creatinin. Ở hai nhóm tuổi từ 1 tháng đến 8 tuổi không có sự khác biệt tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) giữa nam và nữ.

Tỷ lệ THS/(THE + THF + 5 α -THF) không có sự khác biệt giữa nam và nữ cũng như giữa các khoảng tuổi. Vì nồng độ THS trong mẫu trẻ bình thường rất thấp nên khi tăng nồng độ THS và tỷ lệ (THE + THF + 5 α -THF) là dấu hiệu bất thường quá trình tổng hợp hormon steroid. Tỷ lệ THS/(THE + THF + 5 α -THF) cao đặc trưng cho thiếu 11 β -OH mà hầu như không gặp ở các bệnh lý rối loạn tổng hợp steroid khác như thiếu 21-OH, 3 β -HSD II.

Tỷ lệ DHEA/(THE + THF + 5 α -THF) có sự khác biệt giữa các nhóm tuổi nhưng không khác biệt giữa nam và nữ trong từng nhóm tuổi. Tỷ lệ DHEA/(THE+THF+5 α -THF) cao ở trẻ < 2 tuổi so với trẻ > 2 tuổi. Nghiên cứu của Krone N và cộng sự chỉ ra rằng tỷ lệ DHEA/(THE+THF+5 α -THF) có thể sử dụng để chẩn đoán thiếu 3 β -HSD II do thiếu enzym làm tăng tiền chất là DHEA và giảm tổng hợp cả 3 nhóm hormon thượng thận [11]. Tuy vậy, người bệnh thiếu 21-OH và thiếu 11 β -OH cũng thấy tăng tổng hợp androgen và tăng nồng độ DHEA nên làm tăng tỷ lệ DHEA/(THE +THF+5 α -THF). Do vậy, độ đặc hiệu trong chẩn đoán của tỷ lệ DHEA/ (THE+THF+5 α -THF) không cao.

Có 4 tỷ lệ chẩn đoán được sử dụng trong chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 gồm tỷ lệ THF/5 α -THF, tỷ lệ 5 α -THF/THF và tỷ lệ An/Et hoặc Et/An theo nghiên cứu của Krone N và Chan OK. Trong đó tỷ lệ THF/5 α -THF và 5 α -THF/THF xác định được ở mọi lứa tuổi, đây là hai sản phẩm chuyển hóa của cortisol nên luôn có với nồng độ khác nhau ở các lứa tuổi. Trong khi đó tỷ lệ An/Et và Et/An chỉ xác định ở một số trẻ > 2 tuổi do đây là sản phẩm chuyển hóa của androgen nên nồng độ An và Et rất thấp hầu như không xác định được ở trẻ em < 2 tuổi. Cả 4 tỷ lệ chẩn đoán này thường được áp dụng cho nam nhằm chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 ở người mang nhiễm sắc thể 46,XY. Vì vậy, cần lưu ý khi sử dụng các tỷ lệ chẩn đoán này cho phù hợp với mục đích, có thể thấy tỷ lệ 5 α -THF/THF có khoảng tham chiếu rộng ở trẻ < 2 tuổi (0,27-12,0) trong khi đó tỷ lệ này ở trẻ > 2 tuổi khá hẹp (0,42-3,33) cho thấy sự chênh lệch nồng độ THF và 5 α -THF ít hơn khi trẻ lớn lên.

Tỷ lệ (THF+5 α -THF)/THE sử dụng trong chẩn đoán AME theo như Krone và cộng sự công bố [11]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ (THF + 5 α -THF)/THE có sự khác biệt giữa các nhóm tuổi, ở trẻ 8 - \leq 11 tuổi tỷ lệ này ở nam cao hơn nữ ($p < 0,05$). Chúng tôi chưa phát hiện người bệnh nào mắc AME khi sử dụng tỷ lệ chẩn đoán này.

Như vậy, 4/8 tỷ lệ có giá trị ở mức thấp là 0 hoặc không có giá trị chẩn đoán nên khoảng tham chiếu được lấy là nhỏ hơn giá trị mức cao (< upper limit). Riêng An/Et và 5 α -THF/THF, THF/5 α -THF giá trị thấp của khoảng tham chiếu rất có ý nghĩa nên được sử dụng trong chẩn đoán.

Khoảng tham chiếu tỷ lệ chẩn đoán được Lucas-Herald AK và cộng sự đã thiết lập để chẩn đoán trong một số bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid cho 3 nhóm tuổi < 6 tháng, 6 tháng – 10 tuổi và > 10 tuổi. Tuy nhiên, khi thiết lập khoảng tham chiếu cho tỷ lệ này ở 252 đối tượng tác giả này đưa ra giá trị phân vị thứ 95 của tỷ lệ THS/(THE+THF+5 α -THF) là 0,03 nên có đến 92/93 người bệnh có giá trị cao hơn khoảng tham chiếu [27]. Xây dựng khoảng

tham chiếu giúp phát hiện người bệnh bất thường hướng đến chẩn đoán thiếu hụt enzym nên nếu khoảng tham chiếu không phù hợp dẫn đến không phân loại được người bệnh và gần như toàn bộ người bệnh đều có bất thường như Lucas-Herald AK công bố. Để chẩn đoán thiếu 3β -HSD II tác giả này sử dụng tỷ lệ $DHEA/(THE+THF+5\alpha-THF)$ và phát hiện được 2 trường hợp mắc bệnh này trong số 12/93 người bệnh có tăng tỷ lệ so với khoảng tham chiếu. Tác giả sử dụng 3 tỷ lệ giúp chẩn đoán thiếu 5α -reductase type 2 bao gồm tỷ lệ Et/An , $THF/5\alpha-THF$, và $THB/5\alpha-THB$ phát hiện 2 trường hợp thiếu enzym. Bên cạnh đó Lucas-Herald AK còn thiết lập một số tỷ lệ chẩn đoán cho thiếu hụt 17β -HSD, ACRD, AME tuy nhiên chưa thấy công bố phát hiện trường hợp mắc bệnh này do những bệnh này rất hiếm gặp [27]. So sánh với khoảng tham chiếu được công bố của tác giả Lucas Herald, chúng tôi nhận thấy kết quả tham chiếu các tỷ lệ có sự khác biệt do cách chia khoảng tuổi khác nhau, cỡ mẫu khác nhau. Tuy nhiên, độ nhạy của các tỷ lệ được tác giả công bố đều là 100 (%) và độ đặc hiệu khoảng 78-94% tùy từng tỷ lệ và giá trị dự đoán dương tính rất thấp chỉ từ 11-45%.

Trong nghiên cứu của chúng tôi chưa có một số tỷ lệ chẩn đoán đặc hiệu cho thiếu 21-OH ở trẻ sơ sinh như các tác giả khác trên thế giới. Homma K nhận thấy tỷ lệ $PTL/(\beta THE + \alpha THE)$ rất có giá trị trong chẩn đoán TSTTBS do thiếu 21-OH và tỷ lệ này đặc hiệu hơn so với tỷ lệ $17OHPN/(THE + THF + 5\alpha-THF)$ và $PT(THE + THF + 5\alpha-THF)$ ở mẫu nước tiểu ngẫu nhiên [12]. Kamrath C cũng nhận thấy ở trẻ sơ sinh việc sử dụng tỷ lệ $PTL/6OH-THE$ và $PTL/(6OH-THE + THE)$ rất đặc hiệu trong chẩn đoán thiếu 21-OH so với tỷ lệ PT/THE và $17OHPN/THE$ [85]. Việc sử dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu với các tỷ lệ chẩn đoán đặc hiệu giúp khắc phục những trường hợp dương tính giả gặp phải trong sàng lọc TSTTBS do thiếu 21-OH. Tuy nhiên, chúng tôi chưa định lượng được PTL cũng như α và β -THE, 6OH-THE vì vậy cũng cần triển khai thêm để tăng thêm công cụ hữu ích cho chẩn đoán thiếu 21-OH ở trẻ

sơ sinh. Bên cạnh đó, những trường hợp nghi ngờ mắc TSTTBS ở trẻ sơ sinh mà kết quả định lượng steroid niệu âm tính cần làm phân tích gen CYP21A2.

4.3. Kết quả steroid niệu ở người bệnh rối loạn tổng hợp hormon steroid

Nghiên cứu được thực hiện với 200 người bệnh tại hai bệnh viện lớn là Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Hữu Nghị Việt Đức đã phát hiện 126 người bệnh mắc 4 nhóm bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid: 106 người bệnh thiếu 21-OH, 5 người bệnh thiếu 11 β -OH, 14 người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 và một người bệnh thiếu 3 β -HSD II (bảng 3.16). Đây là số lượng người bệnh rất lớn mắc TSTTBS thể thiếu 21-OH, thiếu 11 β -OH, thiếu 3 β -HSD II và RLPTGT do thiếu 5 α -reductase type 2 lần đầu được chẩn đoán dựa vào định lượng steroid niệu tại Việt Nam. Tuy vậy, còn 74/200 người bệnh (37%) chưa được chẩn đoán do không phát hiện mẫu hình đặc trưng đủ tiêu chuẩn với các bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp steroid tỷ lệ cao nhất là ở nhóm trẻ sơ sinh với 17/44 trẻ.

Tuổi chẩn đoán lần đầu sớm nhất là từ 1 ngày tuổi (6 giờ) đối với thiếu 21-OH, 3 tháng với thiếu 11 β -OH và 6 tháng tuổi với thiếu 5 α -reductase type 2. Kết quả này cũng tương tự như các nghiên cứu đã công bố trước đây của các tác giả trong và ngoài nước là định lượng steroid niệu giúp chẩn đoán TSTTBS thể thiếu 21-OH, thiếu 11 β -OH ở trẻ sơ sinh nhưng chỉ có thể chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 ở trẻ sau 3 tháng tuổi [8],[64].

Đặc điểm steroid niệu ở người bệnh thiếu 21-OH chưa điều trị

Độ tuổi làm xét nghiệm định lượng steroid niệu cho trẻ từ 1 ngày tuổi đến 17 tuổi, trong đó 11/37 người bệnh (29,73%) được chẩn đoán trong tháng đầu đặc biệt người bệnh đến sớm nhất là 6 giờ sau sinh. Có 9/37 người bệnh (24,32%) được chẩn đoán trong độ tuổi 1 tháng – <2 tuổi. Tuy vậy, vẫn có 4/37 người bệnh được chẩn đoán muộn sau 8 tuổi, ba người bệnh là người dân tộc H'mông ở Lào Cai, Hà Giang không có điều kiện để khám và điều trị bệnh

sớm. Những người bệnh này đều thuộc thể nam hóa đơn thuần không có rối loạn điện giải vì vậy không nguy hiểm đến tính mạng nên điều trị muộn. Do đặc điểm bệnh TSTTBS cần điều trị sớm, tránh biến chứng con suy thượng thận cấp nên rất nhiều người bệnh được điều trị ngay khi vào viện, khi nghi ngờ mắc TSTTBS mà chưa được chẩn đoán xác định nhằm tránh những biến chứng nặng như sốc, con suy thượng thận cấp gặp ở khoảng 35(%) người bệnh mắc TSTTBS [110].

Kết quả phân tích steroid niệu ở 37 người bệnh mắc thiếu 21-OH chưa điều trị cho thấy có xuất hiện rõ đỉnh 17OHPN và PTL. Đây là steroid đặc trưng cho thiếu 21-OH, vì vậy sự xuất hiện của các đỉnh 17OHPN và PTL là tiêu chuẩn định tính quan trọng giúp định hướng chẩn đoán thiếu 21-OH bằng kỹ thuật phân tích steroid niệu.

Ở người bệnh thiếu 21-OH, tăng cường tổng hợp androgen nên gây ra triệu chứng nam hóa trẻ nữ (phì đại âm vật), dậy thì sớm ở trẻ trai, xét nghiệm máu thường thấy testosterone cao. Nồng độ PT ở người bệnh thiếu 21-OH cao hơn khoảng 100 lần so với nhóm chứng (bảng 3.19). PT là sản phẩm chuyển hóa của 17-OHP, tiền chất để tổng hợp cortisol. Ở người bệnh TSTTBS do thiếu 21-OH, giảm tổng hợp cortisol gây tăng 17-OHP và do vậy tăng bài tiết PT ra nước tiểu. Nồng độ PT cao là chỉ dấu quan trọng trong chẩn đoán thiếu 21-OH bên cạnh sự tăng nồng độ PTL hay tăng tỷ lệ PT so với sản phẩm chuyển hóa của cortisol [7], [12]. Nồng độ An và Et ở người bệnh thiếu 21-OH cao hơn nhóm chứng do tăng sản phẩm chuyển hóa của androgen.

Tỷ lệ $PT/(THE + THF + 5\alpha-THF)$ ở 100% người bệnh thiếu 21-OH cao hơn tham chiếu (bảng 3.20). Nồng độ PT cùng với tỷ lệ $PT/(THE + THF + 5\alpha-THF)$ cao hơn khoảng tham chiếu kết hợp với sự xuất hiện của đỉnh PTL và 17OHPN trên sắc ký đồ là tiêu chuẩn chẩn đoán thiếu 21-OH. Ở người bệnh thiếu 21-OH chúng tôi nhận thấy 100% người bệnh có tỷ lệ $THS/(THE + THF$

+ 5α -THF) trong giới hạn bình thường. Tuy nhiên có 13/37 người bệnh (35,1%) thiếu 21-OH chưa điều trị có tỷ lệ DHEA/(THE+THF+ 5α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu. Có thể do DHEA là tiền chất để tổng hợp cortisol tại vị trí phía trước của enzym 21-OH nên khi thiếu 21-OH sẽ làm tăng 17OHP và tăng DHEA. Thiếu enzym 21-OH nên quá trình sinh tổng hợp hormon thượng thận được tăng cường theo con đường tổng hợp androgen nên làm tăng nồng độ DHEA. Cá biệt có 1 người bệnh chẩn đoán thiếu 21-OH (mã VD02) lần đầu tiên ở tuổi 17, xét nghiệm có tỷ lệ DHEA/(THE+THF+ 5α -THF) rất cao (6,54 so với 0,17 là giới hạn trên của khoảng tham chiếu). Vì vậy độ đặc hiệu của tỷ lệ chẩn đoán DHEA/(THE + THF + 5α -THF) trong nghiên cứu của chúng tôi và các tác giả khác chỉ đạt khoảng 70-90% [90].

Xét nghiệm 17-OHP được làm cho 18/37 người bệnh thiếu 21-OH chưa điều trị kết quả có 16/18 người bệnh cao hơn khoảng tham chiếu ở phụ lục 7 [123]. Tuy vậy, còn 2/18 người bệnh có nồng độ 17-OHP trong giới hạn bình thường. Như vậy nếu sử dụng 17-OHP để chẩn đoán thiếu 21-OH thì sẽ bỏ sót 2/18 người bệnh.

Nồng độ cortisol lúc 8-10 giờ được làm cho 8/37 người bệnh, tuy nhiên có 7/8 người bệnh có kết quả bình thường. Nguyên nhân gây ra nồng độ cortisol bình thường ở người bệnh TSTTBS có thể do nồng độ cortisol ở thời điểm lấy mẫu không giảm như trong danh mục các công trình đã công bố- số 1. Một nguyên nhân khác có thể lý giải do kỹ thuật định lượng cortisol bằng phương pháp miễn dịch (điện hóa phát quang) đang thực hiện tại khoa Hóa sinh bị nhiễu bởi nồng độ 17-OHP cao ở người bệnh thiếu 21-OH gây phản ứng chéo với thuốc thử định lượng cortisol. Đã có những công bố về phản ứng nhiễu khi định lượng cortisol ở người bệnh TSTTBS do thiếu 21-OH và thiếu 11β -OH do tiền chất của cortisol tăng trong huyết tương người bệnh gây phản ứng chéo làm tăng giả tạo nồng độ cortisol trong máu của người bệnh TSTTBS [33]. Hơn nữa

nồng độ cortisol có thể tăng ngay khi người bệnh bị stress, lo lắng khi lấy máu, khi thăm khám tại bệnh viện nên cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả. Vì vậy, nồng độ cortisol không được sử dụng là tiêu chuẩn để chẩn đoán TSTTBS do thiếu 21-OH.

Nồng độ ACTH được làm ở 8/37 người bệnh trong đó 6/8 người bệnh cao hơn khoảng tham chiếu, chỉ có 2/8 người bệnh trong giới hạn bình thường. Vì nồng độ ACTH cao là triệu chứng suy tuyến thượng thận ở người bệnh TSTTBS do thiếu 21-OH, những người bệnh được phát hiện và chẩn đoán sớm khi chưa có suy thượng thận nên nồng độ ACTH bình thường.

Có 15 người bệnh mắc thiếu 21-OH chưa điều trị có kết quả natri và kali máu, 11/15 người bệnh có kết quả bình thường là những người bệnh được chẩn đoán muộn sau 2 tuổi nên những bệnh này thường không mắc rối loạn nước điện giải. Những người bệnh mắc TSTTBS thể mất muối thường là trẻ nhỏ < 2 tháng tuổi, được điều trị hydrocortisone ngay khi vào viện nên thuộc nhóm lấy mẫu nước tiểu sau khi điều trị hydrocortisone.

Để đánh giá giá trị chẩn đoán của nồng độ PT ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) và tỷ lệ $\text{PT}/(\text{THE} + \text{THF} + 5\alpha\text{-THF})$ trong chẩn đoán thiếu 21-OH, chúng tôi phân tích đường cong ROC. Nồng độ PT là 1,875 ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) có độ đặc hiệu 95,9%, giá trị dự đoán dương tính 89,4% với TSTTBS do thiếu 21-OH. Với điểm cắt 0,025 thì tỷ lệ $\text{PT}/(\text{THE} + \text{THF} + 5\alpha\text{-THF})$ có độ nhạy 77,1% độ đặc hiệu 61%, giá trị dự đoán dương tính là 59,6% với TSTTBS do thiếu 21-OH. Nghiên cứu của Lucas-Herald AK và cộng sự lại lấy điểm cắt là tại phân vị thứ 95 của khoảng tham chiếu nên các tỷ lệ chẩn đoán đều có độ nhạy 100%, nhưng độ đặc hiệu chỉ là 25% với tỷ lệ $\text{PT}/(\text{THE} + \text{THF} + 5\alpha\text{-THF})$ [27].

Mẫu hình sắc ký đồ toàn thể của người bệnh thiếu 21-OH rất đặc trưng với đỉnh 17OHPN, PT và PTL cao (hình 3.12) tương tự với công bố của Chan OK và cộng sự [8]. Các sản phẩm đặc trưng cho thiếu 21-OH có các mảnh ion đặc trưng mô tả trong biểu đồ 3.13 (17OHPN), biểu đồ 3.14 (PTL) cùng với

thời gian lưu được công bố trong bảng 2.1 là công cụ hữu ích để phân tích sắc ký đồ phát hiện người bệnh thiếu 21-OH.

Phân tích đột biến gen CYP21A2 là tiêu chuẩn khẳng định chẩn đoán thiếu 21-OH, kỹ thuật phân tích gen rất hữu ích trong nhiều trường hợp đặc biệt ở trẻ sơ sinh. Tuy vậy, kỹ thuật này đòi hỏi thiết bị, nhân lực, giá thành và thời gian có kết quả dài cũng như không sử dụng để theo dõi điều trị. Trong số 37 người bệnh thiếu 21-OH chưa điều trị phát hiện bằng định lượng steroid niệu có 13 người bệnh được phân tích gen CYP21A2 và được khẳng định có đột biến gây bệnh (phụ lục 6).

Tại Việt Nam, trước khi có các xét nghiệm khẳng định chẩn đoán như định lượng steroid niệu, phân tích đột biến gen thì phần lớn người bệnh tại khoa Nội tiết – Chuyên hóa – Di truyền được chẩn đoán TSTTBS dựa vào các dấu hiệu lâm sàng điển hình như nam hóa trẻ nữ, dậy thì sớm trẻ nam, sạm da, mất nước, con suy thượng thận cấp. Bên cạnh đó là dựa vào một số xét nghiệm máu như tăng nồng độ 17-OHP, testosterone, progesterone, ACTH, natri và kali. Tuy nhiên, nếu chỉ sử dụng các xét nghiệm trên thì không thể chẩn đoán xác định người bệnh mắc TSTTBS, và không thể xác định TSTTBS do thiếu enzym 21-OH hay 11 β -OH hay thể bệnh khác. Đến khi áp dụng thành công kỹ thuật phân tích gen CYP21 thì chúng ta mới có thể chẩn đoán xác định TSTTBS do thiếu 21-OH [111],[112]. Tuy vậy, còn một số bất cập khi không thể phân tích gen cho tất cả người bệnh nghi mắc TSTTBS do giá thành cao, thời gian lâu và đặc biệt có một số trường hợp không phát hiện đột biến gen ở người bệnh có dấu hiệu lâm sàng điển hình [13]. Không có sự tương ứng hoàn toàn giữa kiểu gen và mức độ biểu hiện của gen trên lâm sàng. Không sử dụng kết quả phân tích gen để theo dõi hiệu quả điều trị và phát hiện quá liều hydrocortisone ở người bệnh TSTTBS. Vì vậy, khi triển khai kỹ thuật định lượng steroid niệu chúng tôi tiến hành đồng thời xét nghiệm máu và nước tiểu, những trường hợp chẩn

đoán rõ ràng bằng định lượng steroid niệu sẽ được kết luận, những trường hợp chưa rõ ràng sẽ đề nghị làm lại steroid niệu lần hai hoặc phân tích gen.

Đặc điểm steroid niệu ở người bệnh thiếu 11 β -OH chưa điều trị

Trong nghiên cứu này, phân tích steroid niệu bằng GC/MS phát hiện năm người bệnh mắc thiếu 11 β -OH trong đó ba người bệnh chưa điều trị hydrocortisone. Ba người bệnh đã được khẳng định chẩn đoán bằng phân tích có đột biến gây bệnh trên gen CYP11B1. Trong đó người bệnh nhỏ tuổi nhất là 3 tháng tuổi. Đặc biệt thêm có một người bệnh (mã VN80) mắc đồng thời thiếu 21-OH và thiếu 11 β -OH khi phân tích gen tuy nhiên đặc điểm lâm sàng và định lượng steroid niệu nổi bật với hình ảnh thiếu 21-OH nên chúng tôi phân tích ở phần thiếu 21-OH.

Ba người bệnh thiếu 11 β -OH, đều là nam với triệu chứng lâm sàng nổi bật ở người bệnh thiếu 11 β -OH là sạm da, dậy thì sớm tương tự như người bệnh thiếu 21-OH thể cổ điển (bảng 3.23). Dấu hiệu dậy thì rất sớm ngoại vi được thể hiện rõ trong hình 4 phụ lục 7. Trong khi đó, tuổi dậy thì bình thường ở nam là 10-12 tuổi, ở người bệnh thiếu 11 β -OH có thể gặp dậy thì lúc 2 - 5 tuổi. Dấu hiệu tăng huyết áp người trẻ rất đặc trưng cho thiếu 11 β -OH mà không gặp ở người bệnh thiếu 21-OH. Tuy nhiên, tăng huyết áp thường gặp ở người bệnh từ tuổi thiếu niên và thanh niên, không gặp ở trẻ nhỏ [3], do vậy biểu hiện lâm sàng và định lượng 17-OHP có thể không phân biệt được thiếu 21-OH và thiếu 11 β -OH trong những trường hợp này.

Đặc điểm định lượng steroid niệu ở người bệnh thiếu 11 β -OH cho thấy nồng độ THS và tỷ lệ THS/ (THE + THF + 5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu (bảng 3.24). Đây là tiêu chuẩn chẩn đoán thiếu 11 β -OH bằng định lượng steroid niệu trên GC/MS. Tiêu chuẩn này được mô tả bởi nhiều tác giả trên thế giới như Krone N và cộng sự [11], Chan OK và cộng sự [8], Lucas –Herald AK [27]. Do THS là sản phẩm chuyển hóa của 11-deoxycortisol tiền chất tổng hợp nên

cortisol ngay bước do enzym 11β -hydroxylase xúc tác, thiếu 11β -OH là tăng hợp chất S trong máu và tăng THS tương ứng trong nước tiểu. Vì vậy, THS cao gặp ở người bệnh thiếu 11β -OH mà ít gặp ở các thể TSTTBS khác. Tuy vậy, nồng độ PT và tỷ lệ $PT/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$ cao hơn khoảng tham chiếu ở 1/3 người bệnh thiếu 11β -OH do tăng tiền chất bước thứ 2 trước vị trí thiếu hụt enzym. Người bệnh thiếu 11β -OH có tỷ lệ $PT/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$ cao hơn khoảng tham chiếu được làm phân tích gen CYP21A2 và không phát hiện đột biến gen nên loại trừ thiếu 21-OH kết hợp với thiếu enzym 11β -OH. Do vậy, từ kết quả này chúng tôi nhận thấy, để chẩn đoán thiếu enzym 11β -OH cần dựa vào tỷ lệ $THS/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$ cao hơn khoảng tham chiếu trong khi chẩn đoán thiếu 21-OH cần tiêu chuẩn tỷ lệ $PT/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$ cao và tỷ lệ $THS/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$ trong giới hạn bình thường.

Phân tích biểu đồ ROC cho thấy THS với điểm cắt là 0,095 ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinin) có độ nhạy 63,6% và độ đặc hiệu 86,2% trong chẩn đoán thiếu 11β -OH, giá trị dự đoán dương tính là 77,3%. Độ nhạy, độ đặc hiệu và giá trị dự đoán dương tính của tỷ lệ $THS/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$ ở điểm cắt 0,004 (lần lượt là 64,1%; 59,9%; 69,1%). Biểu đồ 3.20 và 3.21 cho thấy nồng độ THS và tỷ lệ $THS/(THE + THF + 5\alpha\text{-THF})$ cao ở người bệnh thiếu 11β -OH. Hình ảnh sắc ký đồ toàn thể đặc trưng cho người bệnh thiếu 11β -OH với đỉnh THS rất cao trong khi đỉnh THE, THF thường thấp hơn so với mẫu bình thường (biểu đồ 3.19). Phân tích gen CYP11B1 giúp chúng tôi khẳng định chẩn đoán ở những trường hợp kết quả định lượng steroid niệu có dấu hiệu gợi ý thiếu 11β -OH (phụ lục 6).

Tóm lại, định lượng steroid niệu cho người bệnh nghi mắc TSTTBS giúp chẩn đoán xác định thiếu 11β -OH và phân biệt với thiếu 21-OH. Kết hợp giữa phát hiện dấu hiệu lâm sàng như tăng huyết áp khi còn trẻ, dậy thì sớm, với định lượng steroid niệu và khi có bất thường về kết quả định lượng steroid niệu

tiến hành phân tích gen để khẳng định là cách chẩn đoán phù hợp, giúp bác sỹ lâm sàng trong phân biệt thể TSTTBS.

Đặc điểm steroid niệu ở người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2

Nguyên nhân thường gặp gây ra rối loạn phát triển giới tính ở người mang nhiễm sắc thể 46,XY thường gặp do thiếu 5 α -reductase type 2, không nhạy cảm với androgen, thiếu 3 β -HSD type II, bên cạnh một số nguyên nhân hiếm gặp như tăng sản thượng thận thể lipid hóa, thiếu Cyt P450 oxidoreductase, thiếu 17-hydroxylase/17,20 lyase hay thiếu 17 β -HSD type 3 [124],[125]. Thiếu 5 α -reductase type 2 gây giảm tổng hợp 5 α -DHT dẫn đến nữ hóa trẻ nam mang nhiễm sắc thể 46,XY với các biểu hiện lâm sàng là bộ phận sinh dục ngoài dạng nữ khi mới sinh với dương vật nhỏ, bìu chẻ đôi, lỗ đái thấp, ỉn tinh hoàn. Việc chẩn đoán xác định thiếu 5 α -reductase type 2 phải dựa vào phân tích steroid niệu hoặc đột biến gen SRD5A2. Do hai kỹ thuật này trước đây chưa được áp dụng tại Việt Nam, nên chỉ một số người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 được chẩn đoán nhờ gửi mẫu ra nước ngoài [17].

Trong nghiên cứu này, 14 người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 có tỷ lệ 5 α -THF/THF thấp và tỷ lệ THF/5 α -THF cao hơn khoảng tham chiếu. Trong khi đó tỷ lệ An/Et thấp hơn khoảng tham chiếu và tỷ lệ Et/An cao hơn khoảng tham chiếu chỉ gặp ở những người bệnh >8 tuổi. Do An và Et là sản phẩm chuyển hóa của androgen nên khi trẻ bắt đầu dậy thì có tăng nồng độ testosterone trong máu làm tăng nồng độ An và Et trong nước tiểu. Trẻ nhỏ nồng độ An và Et rất thấp nên tỷ lệ An/Et ít có giá trị chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2. Kết quả của chúng tôi tương tự với kết quả của Chan OK tại Hồng Kông, 16 bệnh nhân thiếu 5 α -reductase type 2 được xác định, trong đó 15/16 người bệnh có độ tuổi từ 6 tháng đến 26 tuổi được định lượng steroid niệu có biến đổi đặc hiệu là tỷ lệ 5 α -THF/THF từ 0,0 đến 0,08 thấp hơn khoảng

tham chiếu, trong khi tỷ lệ An/Et thấp hơn khoảng tham chiếu ở người bệnh >3 tuổi và trong giới hạn tham chiếu ở trẻ 6 tháng và 10 tháng [64].

Vì thiếu 5 α -reductase type 2 là rối loạn xác định và rối loạn phát triển giới tính chỉ biểu hiện ở nam giới có nhiễm sắc thể 46,XY mà không gây ra triệu chứng rối loạn phát triển giới tính ở nữ. Trong bảng 3.26 cho thấy tất cả người bệnh đều là nam mang nhiễm sắc thể 46,XY không có bất thường ở mức độ nhiễm sắc thể. Các người bệnh đều có bộ phận sinh dục ngoài bất thường với dấu hiệu nữ hóa như bìu chẻ đôi, dương vật nhỏ, lỗ đái thấp và nhiều người bệnh được đặt tên và khai sinh là nữ khi mới sinh. Dấu hiệu ẩn tinh hoàn có thể gặp ở một vài người bệnh với 1 hoặc cả hai bên. Thiếu 5 α -reductase type 2 là bệnh di truyền nên gặp hai cặp anh em trong hai gia đình đều mắc căn bệnh này là cặp người bệnh mang mã nghiên cứu VD13 và VD14, cặp anh em mang mã VD15 và VD16 có các triệu chứng lâm sàng giống nhau. Những hình ảnh đặc trưng cho người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 được thể hiện rõ trong phụ lục 7 với bộ phận sinh dục dạng nữ (hình 5-phụ lục 7) hay hình ảnh của hai anh em trong một gia đình mắc thiếu 5 α -reductase type 2 với ngoại hình nam, bộ phận sinh dục nam nhưng dương vật nhỏ, lỗ đái thấp ở gốc dương vật đã phẫu thuật, hai tinh hoàn bình thường, trẻ chưa có dấu hiệu dậy thì khi đã 13 tuổi (hình 6-phụ lục 7). Một hình ảnh của người bệnh 13 tuổi, có ngoại hình nữ, bộ phận sinh dục nam nhưng dương vật teo nhỏ không phát triển, bìu chẻ đôi, lỗ đái thấp, hai tinh hoàn bình thường trong bìu, chưa có dấu hiệu dậy thì ở thời điểm 12,3 tuổi (hình 7-phụ lục 7).

Phân tích biểu đồ ROC cho thấy tỷ lệ THF/5 α -THF tại điểm cắt 1,39 có độ đặc hiệu trong chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 rất cao đến 91,1%, giá trị dự đoán dương tính là 69,2%. Tỷ lệ THF/5 α -THF ở người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 cao hơn hẳn so với các nhóm còn lại (biểu đồ 3.25). Hình ảnh đặc trưng của sắc ký đồ cho người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 với đỉnh THF

rõ và đỉnh 5α -THF rất thấp (biểu đồ 3.24); không xuất hiện các đỉnh bất thường như 17OHPN, PTL, THS như thiếu 21-OH và 11β -OH tương tự như Chan OK mô tả [64]. Hình ảnh trong biểu đồ 3.23 và 3.24 cho thấy rõ sự khác biệt trong sắc ký đồ giữa mẫu bình thường và mẫu thiếu 5α -reductase type 2, giúp dễ dàng chẩn đoán thiếu 5α -reductase type 2.

Phân tích gen SRD5A2 được thực hiện cho 8/14 người bệnh thiếu 5α -reductase type 2 bằng phương pháp PCR thực hiện tại Trường Đại học Y Hà Nội và giải trình tự gen SRD5A2 tại nước ngoài. Kết quả thu được được cả 8/8 người bệnh phát hiện có đột biến gây bệnh (phụ lục 6). Những đột biến gen SRD5A2 mà chúng tôi gặp đã được nhiều tác giả khác công bố [64],[126]. Bên cạnh những đột biến đã được công bố gây bệnh còn phát hiện thêm một số đột biến mới. Như vậy có sự tương đồng rất cao giữa kết quả định lượng steroid niệu và phân tích gen ở người bệnh thiếu 5α -reductase type 2. Điều này cho phép ứng dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu trong chẩn đoán thiếu 5α -reductase type 2 cho những người bệnh rối loạn phát triển giới tính tại Việt Nam. Nghiên cứu của các tác giả trên thế giới cho thấy, đột biến c.680G>A là đột biến gây bệnh thường gặp ở người bệnh thiếu 5α -reductase type 2 tại Nhật Bản và châu Á [126]. Chan OK và cộng sự phát hiện 12 người bệnh thiếu 5α -reductase type 2 bằng định lượng steroid niệu và phân tích gen SRD5A2 để khẳng định trong đó 2 đột biến cũng gặp ở người bệnh của chúng tôi [64].

Với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, những trường hợp rối loạn phát triển giới tính ở nam mang nhiễm sắc thể 46,XY sẽ đề nghị làm định lượng steroid niệu, trường hợp nghi ngờ mắc thiếu 5α -reductase type 2 được đề nghị làm phân tích gen SRD5A2 để khẳng định. Đây là quy trình thích hợp giúp chẩn đoán sớm cho người bệnh mắc 5α -reductase type 2 và phân biệt với hội chứng không nhạy cảm androgen. Người bệnh được chẩn đoán sớm thiếu 5α -reductase type 2 và được điều trị sớm đem lại hiệu quả cao cho người bệnh.

Đặc điểm steroid niệu ở người bệnh thiếu 3 β -HSD type II

Thiếu 3 β -HSD II là bệnh TSTTBS rất hiếm gặp với tần xuất khoảng 1: 1.000.000 trẻ sinh sống do đột biến gen HSD3B2 [127]. Trong số 200 người bệnh được định lượng steroid niệu, chúng tôi chỉ phát hiện được 1 người bệnh có dấu hiệu tăng DHEA đơn thuần không kèm theo các dấu hiệu TSTTBS do thiếu 21-OH và thiếu 11 β -OH. Đặc điểm xét nghiệm định lượng steroid niệu của người bệnh nam 27 tuổi, nghi ngờ thiếu 3 β -HSD type II được thể hiện trong bảng 3.28 với duy nhất tăng nồng độ DHEA (8,6 μ mol/mmol creatinin) và tỷ lệ DHEA/ (THE + THF + 5 α -THF) 2,55 cao hơn gấp 15 lần giá trị trên của khoảng tham chiếu. Sắc ký đồ người bệnh mang mã VN109 thể hiện trong biểu đồ 3.26 cho thấy không có các đỉnh 17OHPN, PTL, THS đặc trưng cho thiếu 21-OH và thiếu 11 β -OH. Đỉnh An và Et cao chứng tỏ sản phẩm chuyển hóa của androgen cao. Đỉnh THF và 5 α -THF cao, tỷ lệ THF/5 α -THF bình thường nên người bệnh này không thiếu 5 α -reductase type 2. Tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) và tỷ lệ THS/(THE + THF + 5 α -THF) giới hạn bình thường nên loại trừ thiếu 21-OH và thiếu 11 β -OH.

Nồng độ DHEA của người bệnh mã VN109 cao gấp 39 lần giới hạn trên của khoảng tham chiếu cho trẻ từ 8-11 tuổi. Vì nghiên cứu này không thiết lập khoảng tham chiếu cho người trưởng thành nên việc so sánh kết quả nồng độ DHEA của người bệnh với trẻ 8-11 là chưa thật sự chính xác. Do đó chúng tôi thử tìm khoảng tham chiếu DHEA và tỷ lệ DHEA/ (THE + THF + 5 α -THF) của các tác giả khác trên thế giới, trong đó Lucas-Herald AK công bố tỷ lệ chẩn đoán DHEA/ (THE + THF + 5 α -THF) xây dựng cho 134 người từ 10-18,5 tuổi có giá trị phân vị thứ 95 là 0,14 trong giới hạn từ 0-0,31 [27]. Nếu so sánh tỷ lệ DHEA/(THE + THF + 5 α -THF) của người bệnh VN109 là 2,55 với giá trị tham chiếu của Lucas-Herald thì tỷ lệ này cao hơn 18 lần.

Caulfield MP và cộng sự cho rằng có thể chẩn đoán 3 β -HSD type II dựa

vào tỷ lệ Pregnenetriol/Pregnenetriolone và tỷ lệ DHEA/(THE + THF +5 α -THF). Ông phát hiện 1 trường hợp thiếu 3 β -HSD type II được làm định lượng steroid niệu lúc 7 và 14 ngày tuổi có tỷ lệ Pregnenetriol/Pregnenetriolone tăng cao hơn khoảng tham chiếu [7]. Krone N và cộng sự chẩn đoán 2 trường hợp thiếu 3 β -HSD type II dựa vào tỷ lệ Pregnenetriol/(THE + THF +5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu [11]. Lucas-Herald AK cũng cho rằng dựa vào tỷ lệ DHEA/(THE + THF +5 α -THF) giúp phát hiện các trường hợp nghi ngờ mắc thiếu 3 β -HSD type II bằng định lượng steroid niệu [27].

Ở nghiên cứu của chúng tôi, người bệnh đã 27 tuổi có nồng độ androstenedione, FSH, LH cao hơn tham chiếu (bảng 3.30). Do 3 β -HSD type II xúc tác phản ứng tổng hợp testosterone từ androstenedione nên khi giảm hoạt độ 3 β -HSD type II gây tăng androstenedione và FSH, LH. Tuy vậy, người bệnh này có nồng độ testosterone trong giới hạn bình thường, kết quả này có thể xảy ra vì đã có công bố ở người bệnh thiếu 3 β -HSD type II có kết quả testosterone bình thường và tinh dịch đồ bình thường về số lượng tinh trùng [127]. So với triệu chứng lâm sàng của người bệnh thiếu 3 β -HSD type II thể cổ điển mất muối được công bố ở 2 người bệnh nữ với triệu chứng suy thượng thận, hạ natri, nam hóa không hoàn toàn (lỗ đái thấp, dương vật nhỏ) [16], chúng tôi nhận thấy có thể người bệnh trong nghiên cứu của chúng tôi là thể không cổ điển với triệu chứng nhẹ hơn không có dấu hiệu suy thượng thận, mất muối. Lâm sàng chỉ có dấu hiệu nam hóa không hoàn toàn mặc dù nồng độ testosterone trong giới hạn bình thường của nam nhưng nồng độ FSH, LH cao.

Hiện tại chúng tôi chưa có điều kiện phân tích gen HSD3B2 cho người bệnh do kỹ thuật này chưa được triển khai tại Việt Nam. Các nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng những trường hợp nghi ngờ thiếu 3 β -HSD type II phát hiện bằng sàng lọc, bằng định lượng steroid niệu nên khẳng định bằng phân tích gen HSD3B2 [127],[128].

4.4. Ứng dụng định lượng steroid trong chẩn đoán ở người bệnh nghi mắc TSTTBS đã điều trị hormon thay thế

Trong nghiên cứu này, bằng kỹ thuật định lượng steroid niệu chúng tôi xác định được 116 người bệnh mắc TSTTBS thể thiếu 21-OH và 5 người bệnh thiếu 11 β -OH trong đó có 73,2% người bệnh đã được điều trị hydrocortisone. Tuy vậy, chúng tôi nhận thấy, nhiều người bệnh vẫn còn dấu hiệu đặc trưng cho TSTTBS thể thiếu 21-OH và thiếu 11 β -OH. Kết quả cho thấy có sự biến đổi rõ rệt nồng độ các steroid niệu theo hướng tăng nồng độ THE, THF, 5 α -THF và giảm nồng độ PT. Như vậy, kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS không chỉ giúp chẩn đoán ở người bệnh chưa điều trị mà còn có thể chẩn đoán xác định thiếu 21-OH và 11 β -OH ở nhiều người bệnh đã điều trị. Nguyên nhân có thể do khi mới điều trị nồng độ các tiền chất, sản phẩm chuyển hóa trung gian của cortisol còn trong máu nên được phát hiện trong nước tiểu. Hơn nữa, liệu điều trị có thể chưa đủ ức chế tuyến thượng thận sản sinh tiền chất và sản phẩm trung gian của cortisol nên chẩn đoán bằng định lượng steroid niệu vẫn có mẫu hình đặc trưng cho nguyên nhân gây TSTTBS.

Đặc điểm steroid niệu ở người bệnh thiếu 21-OH đã điều trị

Trong số 106 người bệnh thiếu 21-OH được chẩn đoán bằng định lượng steroid niệu có 69 người bệnh đã điều trị hydrocortisone. Phần lớn những bệnh này được điều trị ngay khi vào viện và lấy nước tiểu làm định lượng steroid niệu sau khi điều trị một vài ngày. Biểu đồ 3.30 cho thấy số người bệnh đã điều trị từ 1 ngày đến 1 tuần chiếm 24,5%.

Nồng độ PT, An, DHEA ở nhóm thiếu 21-OH đã điều trị thấp hơn so với nhóm chưa điều trị, nồng độ THE, THF, 5 α -THF, cortolone và cortol cao hơn nhóm chưa điều trị. Do điều trị hydrocortisone làm tăng cortisol trong máu, ức chế bài tiết ACTH, giảm tổng hợp androgen tuyến thượng thận, làm tăng nồng độ các sản phẩm chuyển hóa của cortisol và cortisone trong nước tiểu, làm giảm

nồng độ sản phẩm chuyển hóa của androgen. Riêng nồng độ Et, A³ và THS không có sự khác biệt giữa nhóm người bệnh thiếu 21-OH chưa điều trị và sau điều trị do A³ và THS không thay đổi ở người bệnh thiếu 21-OH.

Trong số 69 người bệnh thiếu 21-OH đã điều trị có 67/69 người bệnh nồng độ PT cao hơn so với khoảng tham chiếu, 58/69 người bệnh có tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu. Có 8/69 người bệnh có tỷ lệ DHEA/(THE + THF + 5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu (11,6%), tuy nhiên thấp hơn so với nhóm chưa điều trị (35,1%). Do sự ảnh hưởng của điều trị hydrocortisone đến chẩn đoán TSTTBS bằng kỹ thuật định lượng steroid niệu nên nhiều nghiên cứu trên thế giới đều lựa chọn lấy mẫu trước điều trị như điều kiện bắt buộc. Với những trường hợp không thể lấy mẫu trước khi điều trị do người bệnh mất nước, trong tình trạng nguy kịch cần cấp cứu cần phải điều trị hydrocortisone để cứu người bệnh, việc chẩn đoán TSTTBS có thể phải dùng đến phân tích gen nếu kết quả định lượng steroid niệu sau điều trị không còn điển hình. Có 15,9% người bệnh thiếu 21-OH được chẩn đoán dựa vào nồng độ PT cao hơn khoảng tham chiếu trong khi tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) trong giới hạn bình thường, đây là những người bệnh đã được điều trị hydrocortisone nên nồng độ cortisol trong máu và sản phẩm chuyển hóa của cortisol trong nước tiểu như THE, THF, 5 α -THF tăng ngay sau điều trị. Tuy nhiên ở những người bệnh này nồng độ PT còn cao hơn khoảng tham chiếu và vẫn có mặt đỉnh PTL trên sắc ký đồ đặc trưng cho thiếu 21-OH.

Từ kết quả định lượng steroid niệu chúng tôi phát hiện 8/69 chiếm tỷ lệ 11,6% người bệnh mắc thiếu 21-OH có nồng độ DHEA và tỷ lệ DHEA/(THE + THF + 5 α -THF) cao tương tự như thiếu 3 β -HSD II. Điểm khác biệt là bệnh nhân thiếu enzym 3 β -HSD II khi phân tích steroid niệu không phát hiện thấy các đỉnh PTL, 17-OHPN và nồng độ PT, tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) trong giới hạn bình thường. Do vậy việc phân tích mẫu hình sắc ký đồ đặc

trung, kết hợp nồng độ steroid và tỷ lệ đặc trưng cho mỗi bệnh lý thiếu enzym là rất hữu ích cho chẩn đoán.

Thiếu 11β -OH đã điều trị: trong số 5 người bệnh thiếu 11β -OH, có 2 người bệnh đã điều trị hydrocortisone. Tuy nhiên, nồng độ THS và tỷ lệ THS/(THE + THF + 5α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu. 1 người bệnh có nồng độ DHEA và tỷ lệ DHEA/(THE + THF + 5α -THF) cao hơn so với nhóm chứng. Có thể do bệnh nhân thiếu 11β -OH gây giảm tổng hợp hormon steroid theo con đường tạo thành cortisol và tăng tổng hợp hormon steroid theo con đường tạo thành androgen nên tăng DHEA trong máu và nước tiểu tương tự như ở một số bệnh nhân thiếu 21 -OH mà chúng tôi đã phân tích ở trên.

Chan OK và cộng sự đã công bố 3 trường hợp TSTTBS được định lượng steroid bằng GC/MS khi đã điều trị hydrocortisone, tác giả nhận thấy sau điều trị nồng độ các steroid sản phẩm chuyển hóa của cortisol tăng cao có thể làm mất dấu hiệu chẩn đoán. Tác giả đề xuất giải pháp tạm thời điều trị hormon thay thế bằng dexamethasone thay cho hydrocortisone ở trường hợp cần điều trị ngay khi chưa lấy mẫu nước tiểu [8].

4.5. Kết quả định lượng steroid niệu ở các trường hợp chưa xác định

Trong nghiên cứu này, có 74 người bệnh chưa xác định, nhiều người bệnh có dấu hiệu lâm sàng của TSTTBS, rối loạn điện giải, dậy thì sớm tuy nhiên một số người bệnh được điều trị hydrocortisone trước khi lấy mẫu nước tiểu nên không có các dấu hiệu điển hình giúp chẩn đoán rối loạn sinh tổng hợp steroid bẩm sinh. Những người bệnh này chưa được phân tích gen để chẩn đoán nên chưa xác định nguyên nhân bệnh. Vì vậy, tốt nhất nên lấy mẫu nước tiểu trước khi điều trị nhằm đảm bảo giá trị chẩn đoán cho xét nghiệm định lượng steroid niệu, hạn chế các trường hợp âm tính giả do điều trị trước khi lấy mẫu. Một số nguyên nhân gây kết quả âm tính có thể gặp do các tiêu chuẩn lựa chọn

người bệnh là dấu hiệu lâm sàng không hoàn toàn đặc hiệu cho bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid, người bệnh được điều trị trước khi lấy mẫu, một số người bệnh RLPTGT do nguyên nhân khác.

Trong đó, 5 người bệnh thiếu 21-OH và thiếu 11 β -OH được khẳng định bằng phân tích gen tương ứng đã được điều trị bằng hydrocortisone nên không còn dấu hiệu điển hình về GC/MS. Nhiều người bệnh khác chẩn đoán TSTTBS và rối loạn điện giải đã điều trị hormon thay thế.

Một số người bệnh mắc rối loạn điện giải do nguyên nhân không phải bệnh lý tuyến thượng thận (rối loạn tiêu hóa, đái nhạt) do tiêu chuẩn lựa chọn người bệnh trong nghiên cứu này dựa vào các triệu chứng lâm sàng không đặc hiệu. Một số trẻ sơ sinh không phát hiện được dấu hiệu đặc hiệu do hiện tại chúng tôi chưa định lượng được steroid đặc trưng cho trẻ sơ sinh. Một số người bệnh nghi ngờ mắc TSTTBS nhưng không có dấu hiệu đặc trưng trên kết quả định lượng steroid niệu và phân tích gen CYP21A2 âm tính (phụ lục 6).

Hai người bệnh mắc rối loạn phát triển giới tính do bất thường trong quá trình biệt hóa cơ quan sinh dục thời kỳ bào thai gây ra có sự có mặt của cả cơ quan sinh dục nam và nữ trên một cơ thể có tử cung, buồng trứng và tinh hoàn, dương vật được gọi là thể ovotesticular như trong bài báo số 2 của danh mục các công trình công bố của luận án.

Hai người bệnh mắc rối loạn phát triển giới tính do bất thường nhiễm sắc thể (1 người bệnh 45,XO và 1 người bệnh chuyển đoạn hòa nhập tâm giữa nhiễm sắc thể 13 và 14). Những trường hợp bất thường nhiễm sắc thể gây bệnh Turner thể khảm được công bố cho thấy đây là nguyên nhân gây rối loạn phát triển giới tính [129].

Tóm lại, kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS đã được triển khai thành công tại khoa Hóa sinh – Bệnh viện Nhi Trung ương. Kết quả thẩm định phương pháp đáp ứng các tiêu chuẩn về độ chính xác và xác thực. Ứng dụng

thành công kỹ thuật định lượng steroid niệu trong chẩn đoán xác định nhiều bệnh rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid: thiếu 21-OH, thiếu 11 β -OH, thiếu 3 β -HSD II, thiếu 5 α -reductase type 2 ở người bệnh chưa điều trị cũng như một số người bệnh đã điều trị hydrocortisone. Một số trường hợp chưa xác định cần được tiếp tục nghiên cứu.

KẾT LUẬN

1. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng steroid niệu bằng GC/MS và thiết lập khoảng tham chiếu cho trẻ em ≤ 11 tuổi

1.1. Các thông số thẩm định phương pháp

- Giới hạn định lượng đạt 0,05-0,16 ($\mu\text{mol/L}$) với phần lớn các steroid niệu.
- Độ thu hồi các steroid niệu đạt 90-115%.
- Độ lặp lại có CV 1,01-7,72 (%) ở mẫu trộn bình thường và 0,78-9,72 (%) ở mẫu trộn bệnh lý.
- Độ tái lập đạt CV 10,16-14,53 (%) ở mẫu trộn bình thường và 12,51-16,95 (%) ở mẫu trộn bệnh lý.
- Tương quan chặt chẽ giữa kết quả ngoại kiểm của Phòng xét nghiệm với giá trị trung vị với hệ số tương quan r đạt 0,970 - 0,999.

1.2. Giá trị khoảng tham chiếu steroid niệu

- Khoảng tham chiếu 17 steroid niệu và 8 tỷ lệ chẩn đoán được thiết lập cho 4 nhóm tuổi. Tỷ lệ THF/ 5α -THF, 5α -THF/THF, Et/An và An/Et được xây dựng riêng cho nam nhằm chẩn đoán thiếu 5α -reductase type 2.
- Không có sự khác biệt nồng độ steroid niệu giữa nam và nữ ở trẻ < 8 tuổi ngoại trừ PT ở trẻ 1 tháng đến 2 tuổi.
- Nồng độ An, Et, 11keto An, 11OH Et, PD, PT ở nữ cao hơn nam có ý nghĩa thống kê với trẻ 8 - ≤ 11 tuổi.
- Tỷ lệ PT/(THE +THF + 5α -THF) trẻ sơ sinh ở nam cao hơn nữ trong khi ở trẻ 8 - ≤ 11 tuổi ở nữ cao hơn nam ($p < 0,05$).
- Không có sự khác biệt tỷ lệ THS/(THE +THF + 5α -THF) và DHEA/(THE +THF + 5α -THF) giữa nam và nữ ở các nhóm tuổi.

2. Ứng dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS giúp chẩn đoán rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid

2.1. Chẩn đoán thiếu enzym 21-hydroxylase

106 người bệnh được chẩn đoán thiếu 21-OH, trong đó 37 người bệnh chưa điều trị hydrocortisone có đặc điểm:

- Sự xuất hiện đỉnh 17OHPN, PTL là tiêu chuẩn định tính; nồng độ PT và tỷ lệ PT/(THE + THF + 5 α -THF) cao hơn so với khoảng tham chiếu ở người bệnh có dấu hiệu TSTTBS là tiêu chuẩn chẩn đoán thiếu 21-OH, trong khi tỷ lệ THS/(THE + THF + 5 α -THF) trong giới hạn bình thường.
- Nồng độ các steroid niệu An, Et, PD, PT, DHEA ở người bệnh thiếu enzym 21-OH cao hơn nhóm chứng.

3.2. Chẩn đoán thiếu 11 β -hydroxylase

5 người bệnh được chẩn đoán thiếu 11 β -OH, trong đó 3 người bệnh chưa điều trị hydrocortisone có đặc điểm:

- Nồng độ THS và tỷ lệ THS/(THE + THF + 5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu là tiêu chuẩn chẩn đoán thiếu 11 β -OH.
- Nồng độ An, Et, PT, THS cao hơn khoảng tham chiếu.

3.3. Chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2

14 người bệnh là nam, rối loạn phát triển giới tính được chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 khi chưa điều trị có đặc điểm:

- Tỷ lệ THF/5 α -THF cao hơn khoảng tham chiếu là tiêu chuẩn chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2.
- Tỷ lệ An/Et thấp hơn khoảng tham chiếu gặp ở người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2 sau 8 tuổi.

3.4. Chẩn đoán thiếu 3 β -HSD type II

Một người bệnh được chẩn đoán thiếu 3 β -HSD II có đặc điểm sau:

- Tỷ lệ DHEA/(THE + THF + 5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu.
- Tỷ lệ PT/ (THE + THF + 5 α -THF) và THS/(THE + THF + 5 α -THF) trong giới hạn bình thường.

HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

Triển khai thêm định lượng một số steroid niệu quan trọng giúp chẩn đoán TSTTBS như định lượng PTL, THA, THB, THS... giúp ích thêm trong chẩn đoán các bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid.

Xây dựng thêm khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ em > 11 tuổi, người trưởng thành, nhằm chẩn đoán cho người bệnh > 11 tuổi.

Khuyến cáo bác sỹ lâm sàng thực hiện định lượng steroid niệu cho các trường hợp nghi ngờ mắc TSTTBS, RLPTGT, rối loạn điện giải nhằm chẩn đoán các nguyên nhân rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Trần Thị Ngọc Anh, Trần Thị Chi Mai, Trần Minh Điền, Vũ Chí Dũng (2017). Ba người bệnh mắc tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu hụt 21-hydroxylase điều trị muộn tại Bệnh viện Việt Đức. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 457, tháng 8, số 1: 53-57.
2. Trần Thị Ngọc Anh, Nguyễn Việt Hoa, Trần Thị Chi Mai, Trần Minh Điền, Vũ Chí Dũng (2017). Hai trường hợp rối loạn phát triển giới tính thể hiếm gặp được điều trị phẫu thuật tại Bệnh viện Việt Đức. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 457, tháng 8, số 1: 150-154.
3. Trần Thị Ngọc Anh, Trần Thị Chi Mai, Trần Minh Điền (2017). Thảm định quy trình định lượng steroid niệu bằng kỹ thuật sắc ký khí khối phổ. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, tập 21, số 3: 73-78.
4. Trần Thị Ngọc Anh, Trần Thị Chi Mai, Trần Minh Điền, Vũ Chí Dũng (2017). Ứng dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng phương pháp sắc ký khí-khối phổ trong chẩn đoán tăng sản thượng thận bẩm sinh. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 458: 75-84.
5. Mai Thi Chi Tran, Ngọc Anh Thi Tran, Phuong Mai Nguyen, Chi Dung Vu, Minh Dien Tran, Diem Ngoc Ngo, Huy Hoang Nguyen, Ronda F Greaves (2018). 11 β -Hydroxylase deficiency detected by urine steroid metabolome profiling using gas chromatography-mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry* 7: 1-5.
6. Trần Thị Ngọc Anh, Trần Thị Chi Mai, Trần Minh Điền, Ronda F Greaves (2018). Định lượng steroid niệu bằng phương pháp sắc ký khí-khối phổ và ứng dụng lâm sàng. *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, tập 22, số 3: 37-43.
7. Trần Thị Ngọc Anh, Trần Thị Chi Mai, Trần Minh Điền, Vũ Chí Dũng, Ronda F Greaves (2018). Định lượng steroid niệu bằng phương pháp sắc ký khí-khối phổ trong chẩn đoán tăng sản thượng thận bẩm sinh và rối loạn phát triển giới tính. *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, tập 22, số 3: 196-203.

8. Trần Thị Ngọc Anh, Trần Thị Chi Mai, Nguyễn Việt Hoa, Trần Minh Điền, Vũ Chí Dũng, Ronda F Greaves (2019). Thiết lập khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ em bằng kỹ thuật sắc ký khí – khối phổ. *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, số 1: 151-159.
9. Trần Thị Ngọc Anh, Trần Thị Chi Mai, Nguyễn Việt Hoa, Trần Minh Điền, Vũ Chí Dũng, Ronda F Greaves (2019). Ứng dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS trong chẩn đoán rối loạn phát triển giới tính do thiếu enzym 5 α -reductase type 2. *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, phụ san 23, số 3: 445-452.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Miller W.L, Auchus R.J (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32 (1): 81-151.
2. BIASON–LAUBER A, ZACHMANN M (1996). Disorders of Steroid synthesis and metabolism, *Physician's Guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*, Second edition, Springer, 551-572.
3. New M.I, Oksana L, Karen L.S, Alan P et al (2013). Congenital Adrenal Hyperplasia, *Genetic Steroid Disorders*, Elsevier, San Diego, CA.
4. Wong T, Shackleton C.H.L, Thomas R.C and Ellis G (1992). Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17 α -hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clin Chem*, 38, 1830-1837.
5. Pang S.Y, Wallace M.A, Hofman L, Thuline H.C et al (1988). Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics*, 81, 866-874.
6. Rossi C, Calton L, Brown H.A et al (2011). Confirmation of congenital adrenal hyperplasia by adrenal steroid profiling of filter paper dried blood samples using ultra –performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Clin Chem Lab Med* .
7. Caulfield M.P, Lynn T, Gottschalk M.E et al (2002). The diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the newborn by Gas Chromatography/Mass Spectrometry analysis of random urine specimens. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 3682-3690.
8. Chan A.O, Shek C.C (2012). Urinary steroid profiling in the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia and disorders of sex development: Experience of a urinary steroid referral centre in Hong Kong. *Clinical Biochemistry* 46, 327-334.

9. Soara M, Seher P, Lilia B et al (2014). Congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta-hydroxylase deficiency: functional consequences of four CYP11B1 mutations. *Eur J Hum Genet*, 22(5), 610-616.
10. Nguyễn Thị Phương Mai, Nông Văn Hải, Nguyễn Huy Hoàng (2017). Bệnh thiếu hụt 11 β -Hydroxylase. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15(2), 1-13.
11. Krone N, Beverly A.H, Gareth G.L, Paul M.S, Arlt W and Shackleton CHL (2010). Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a preeminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Steroid Biochem Mol Biol* 121, 496-504.
12. Homma K, Hasegawa T, Takeshita E, Wantanabe K et al (2004). Elevated urine pregnanetriolone definitively establishes the diagnosis of classical 21-Hydroxylase deficiency in term and preterm neonates. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 6087-6091.
13. Vũ Chí Dũng (2017). *Nghiên cứu các dạng đột biến gen gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thiếu 21-hydroxylase*, Luận án tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
14. Vũ Chí Dũng, Trần Huy Thịnh, Tạ Thành Văn, Trần Văn Khánh (2016). Phát hiện đột biến xóa đoạn gen CYP21A2 gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-hydroxylase. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 99(1), 8-15.
15. Nguyễn Thị Phương Mai, Nguyễn Thu Hiền, Rita Bernhardt, Nguyễn Huy Hoàng (2014). Đột biến (p.R51K) mới được xác định trên một người bệnh Việt Nam có biểu hiện tăng sản thượng thận bẩm sinh (CAH). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 12, 11-16.
16. Vũ Chí Dũng, Nguyễn Thị Hoàn, Nguyễn Thanh Liêm, Bùi Phương Thảo, Nguyễn Ngọc Khánh, Cán Thị Bích Ngọc, Lê Anh Dũng, Yves Morel

- (2012). Rối loạn phát triển giới tính do đột biến gen 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase type II. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 397, 296-303.
17. Phạm Thu Nga (2012). *Nghiên cứu mô hình rối loạn phát triển giới tính và đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng hội chứng không nhạy cảm androgen*. Luận văn tốt nghiệp bác sỹ nội trú, Trường Đại học Y Hà Nội.
 18. Honour J.W (1997). Steroid profiling. *Ann Clin Biochem*, 34, 32-44.
 19. Hình ảnh cấu trúc hệ thống sắc ký khí – khối phổ.
https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj74WazoniAhXVad4KHQJrCVUQjRx6BAgBEAU&url=https%3A%2F%2Fwww.chromacademy.com%2Fresolver-november2010_Understanding_GCMS_part_1.html&psig=AOvVaw2roc6lipUHIudR4X9RZ_F&ust=1557324009090653
 20. Honour J.W (2010). Steroid assays in paediatric endocrinology. *J Clin Res Ped Endo*, 2, 1-16.
 21. Moon J.Y, Jung H.J, Moon M.H, Chung B.C, Choi M.H (2009). Heat map visualization of gas chromatography-Mass spectrometry based quantitative signatures on steroid metabolism. *J Am Soc Mass Spectrom*, 20, 1626-1637.
 22. Greaves R.F, Ganesh J, Jacqueline K.H, Margaret R.Z (2014). A guide to understanding the steroid pathway: New insights and diagnostic implications. *Clinical Biochemistry*, 47, 5-15.
 23. Westgard J.O (1999). Basic Method validation: Training in analytical quality management for healthcare laboratories, *Westgard Quality Corporation*.

24. Philips I.J, Conway E.M, Hodkinson R.A, Honour J.W (2004). External quality assessment of urinary steroid profile analysis. *Ann Clin Biochem*, 41, 474-478.
25. Garry L.H, Altaie S, James C.B, Cerriot F et al (2010). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; *Approved Guideline-Third edition*, Vol 28, No 30.
26. Nasser A.D, Andrea C.F, Brigitte M.F et al (2015). Estimation of reference curves for the urinary steroid metabolome in the first year of life in healthy children: Tracing the complexity of human postnatal steroidogenesis. *Journal of steroid biochemistry & molecular biology*, 154, 226-236.
27. Lucas-Herald A.K (2015). The pitfalls associated with urinary steroid metabolite ratios in children undergoing investigations for suspected disorders of steroid synthesis, *Int J Pediatr Endocrinol*, 1-10.
28. New M.I (2006). *21-Hydroxylase deficiency: Classical & Nonclassical congenital adrenal hyperplasia*. Edition Elsevier, San Tiago, CA.
29. Van der Kamp H.J and Jan M.W (2004). Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *European Journal of Endocrinology* 151, 71-75.
30. Pearce M, Lenore DeMartino, Rebecca McMahan et al (2016). Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New York State. *Mol Genet Metab Rep*, 7, 1-7.
31. Cacciari E, Balsamo A, Cassio A et al (1983). Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Archives of disease in childhood*, 58, 803-806.
32. Thilén A, Nordenstrom A, Hagenfeldt L et al (1998). Benefits of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in Sweden. *Pediatrics* 101(4), 11-19.

33. Brosnan C.A, Brosnan P, Therrell B.L et al (1998). A comparative cost analysis of newborn screening for classic congenital adrenal hyperplasia in Texas. *Public health reports*, 113, 170-178.
34. Falhammar H, Nordenstrom A (2015). Nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: clinical presentation, diagnosis, treatment, and outcome. *Endocrine*.
35. Selma F.W, Ricardo A (2010). Nonclassical congenital hyperplasia. *International Journal of pediatric endocrinology*. Article ID 625105, 11 pages, doi:10.1155/625105.
36. White P.C, Dupont J, New M.I et al (1991). A mutation in CYP11B1 (Arg 448->His) associated with steroid 11 β -hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. *J Clin Invest*, 87, 1664-1667.
37. Joehrer F, Geley S, Elisabeth M.C, Strasser-Wozak et al (1997). CYP11B1 mutations causing Non-classic adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *Hum Mol Genet*, 6, 1829-1834.
38. Brossaud J, Barat P, Gualde D, Corcutff J,B (2009). Cross reactions elicited by serum 17-OH progesterone and 11-deoxycortisol in cortisol assays. *Clin Chim Acta*, 407, 72-74.
39. Honour J.W, Anderson J.M and Shackleton C.H.L (1983). Difficulties in the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in early infancy: the 11 β -hydroxylase defect. *Acta Endocrinologica*, 103, 101-109.
40. Greaves R, Poomthavorn P, Zacharin M (2006). 11 β -hydroxylase deficiency masked by alternative medicines. *Journal of Pediatrics and Child Health*, 42, 652-654.
41. Nguyen TPM, Nguyen TH, Ngo DN, Vu CD et al (2015). A novel homozygous mutation IVS6+5G>T in CYP11B1 gene in a Vietnamese patient with 11 β -hydroxylase deficiency. *Gene*, 565(2), 291-294.

42. Matallana-Rhoades A.M, Corredor-Castro J.D, Bonilla-Escoba F.J et al (2016). Congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta-hydroxylase deficiency: description of a new mutation, R384X. *Colombia Médica*, 47, 172-175.
43. Lingling Xu, Weibo Xia, Xueyan Wu et al (2015). Chimeric CYP11B2/CYP11B1 causing 11 β -hydroxylase deficiency in Chinese patients with congenital adrenal hyperplasia.
44. Peter M, Janzen N, Sander S, Korsch E, Riepe F.G, Sander J (2008). A case of 11 beta-hydroxylase deficiency detected in a newborn screening program by second-tier LC-MS/MS. *Horm Res*, 69, 253-256.
45. Simard J, Rhéaume E, Sanchez R, Laflamme N, et al (1993). Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Mol Endocrinol*, 7, 716-728.
46. Simard J, Rheaume E, Mebarki F, Sanchez R, New M,I, Morel Y, Labrie F (1995). Molecular basis of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53, 127-138.
47. Waad-Allah S.Mula-Abed, Fathima B.P, Manal K.Al-Kindi et al (2014). Congenital adrenal hyperplasia to 17-alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency presenting hypertension and pseudohermaphroditism: first case report from Oman. *Oman Medical Journal*, 29, 55-59.
48. Katsumata N, Ogawa E, Fujiwara I, Fujikura K (2010). Novel CYP17A1 in a Japanese patient with combined 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase. *Metabolism*, 59, 275-278.
49. Lee M.H, Won P.S, Yoon T.K, Shim S.H (2012). Homozygous CYP17A1 mutation (H373L) identified in a 46,XX female with combined 17 α -hydroxylase/ 17,20-lyase deficiency. *Gynecol Endocrinol*, 28, 573-576.

50. Rubtsov P, Nizhnik A, Dedov I et al (2015). Partial deficiency of 17 α -hydroxylase/17,20-lyase caused by a novel missense mutation in the canonical cytochrome heme-interacting motif. *Eur J Endocrinol*, 172, 19-25.
51. Hashemipour M, Ghasemi M, Hovsepian S (2012). A case of congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Int J Prev Med*, 3, 510-514.
52. Kaur J, Casas L, Himangshu S.B (2016). Lipoid congenital adrenal hyperplasia due to STAR mutations in a Caucasian patient. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*.
53. Idkowiak J, Cragun D, Hopkin R.J et al (2017). Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Gene Reviews*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/NRK1419>.
54. Fukami M, Hasegawa T, Horikawa R et al (2006). Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in three patients initially regarded as having 21-hydroxylase deficiency and /or Aromatase deficiency: Diagnostic value of urine steroid hormone analysis. *Pediatric Research*, 59, 276-280.
55. Fukami M, Nishimura G, Homma K, Nagai T et al (2009). Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: Identification and characterization of biallelic mutations and genotype-phenotype correlations in 35 Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 94, 1723-1731.
56. Zhang G, Rodriguez H, Fardella C et al (1995). Mutation T318M in the CYP11B2 gene encoding P450c11AS (Aldosterone synthase) causes corticosterone methyl oxidase II deficiency. *Am J Hum Genet*, 57, 1037-1043.
57. Haufa BP, Solyom J, Glaz E, Shackleton CHL et al (1991). Severe hypoaldosteronism due to corticosterone methyl oxidase type II deficiency in two boys: metabolic and gas chromatography-mass spectrometry studies. *European Journal of Pediatrics*, 150(3), 149-153.

58. Fardella C.E, Hum D.W, Rodriguez H et al (1996). Gene conversion in the CYP11B2 gene encoding P450c11AS is associated with, but does not cause, the syndrome of Corticosterone methyl oxidase II deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 321-326.
59. Peter M, Bungler K, Solyom J, Sippell W.G (1998). Mutation THR-185 ILE is associated with corticosterone methyl oxidase deficiency type II. *European Journal of Pediatrics*, 157, 378-385.
60. Pascoe L, Curnow K.M, Slutsker L et al (1992). Glucocorticoid suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11B1 and CYP11B2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 8327-8331.
61. Shahrava A, Moinuddin S, Boddu P, Shah R (2016). A case of glucocorticoid remediable aldosteronism and thoracoabdominal aneurysms. *Endocrinology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2017571>.
62. Kato S, Haji M, Yanase T et al (1988). A case of Glucocorticoid suppressible hyperaldosteronism with aldosterone producing adenoma. *Endocrinol. Japon*, 35, 311-320.
63. Prasad P, Mushtaq T (2017). Dexamethasone for the treatment of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency treatment in an adolescent. *Endocrine Abstracts*, 51: <http://doi.org/10.1530/endoabs.51.OC1.1>.
64. Chan A.O, But B.W, Lee C.Y et al (2013). Diagnosis of 5 α -reductase 2 deficiency: is measurement of dihydrotestosterone essential? *Clinical Chemistry*, 59, 798-806.
65. Capin I, Ryan M (2016). 5 α -reductase deficiency in two siblings: a case report. *J Med Cases*, 7, 263-265.

66. Imperato M.G, Gautier T, Peterson R.E, Shackleton C.H.L (1986). The prevalence of 5 α -reductase deficiency in children with ambiguous genitalia in the Dominican Republic. *Journal of Urology*, 136, 867-873.
67. Odame I, Donaldson M.D.C, Wallace A.M, Cochran W, Smith P.J (1992). Early diagnosis and management of 5 α -reductase deficiency. *Archives of Disease in Childhood*, 67, 720-723.
68. Jong D.M, Pulungan A.B, Tridjaja B, Batubara J.R.L (2003). 5-alpha-reductase deficiency: a case report. *Paediatrica Indonesiana*, 43, 11-12.
69. Maleki N, Hormozi M.K, Alamdari M.I, Tavosi Z (2013). 5-alpha reductase 2 deficiency in a woman with primary amenorrhea. Case reports in *Endocrinology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/631060>
70. Miller W.L (2012). The syndrome of 17,20 Lyase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 97, 59-67.
71. Kalthoum M, Rhouma B.B, Elleuch M, Hadjkacem F et al (2018). 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency: Three cases reports. *Endocrine Abstracts*, 56. <http://doi.org/10.1530/endoabs.56.P983>.
72. Tsinopoulou A.G, Serbis A, Kotanidou E.P et al (2018). 46,XY disorder of sex development due to 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in an infant of Greek origin. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 10, 74-78.
73. Yang Z, Ye L, Wang W, Zhao Y et al (2017). 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency: Three case reports and a systematic review. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 174, 141-145.
74. Carani C, Qin K, Simoni M, Serpente S et al (1997). Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *The new England Journal of Medicine*, 337, 91-95.

75. Gargliardi L, Scott H.S, Feng J, Torpy D.J (2014). A case of Aromatase deficiency due to a novel CYP19A1 mutation. *Endocrine Disorders*, 14, 16-22.
76. Hughes I.A, Davies J.D, Bunch T.I, Pasterski V, Mastroyannopoulou K, MacDougall J (2012). Androgen insensitivity syndrome. *The Lancet*, 380, 1419-1428.
77. Galani A, Kitsiou-Tzeli S, Sofokleous C, Kanavakis E, Kalpini-Mavrou A (2008). Androgen insensitivity syndrome: clinicals features and molecular defects. *Hormones*, 7, 217-229.
78. Smith E.P, Boyd J, Frank G.R et al (1994). Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen receptor gene in a man. *New Eng. J. Med*, 331, 1056-1061.
79. Quaynor S.D, Stramdtman E.W, Kim H.G, Shen Y et al (2013). Delayed puberty and estrogen resistance in a woman with estrogen receptor α variant. *N Engl J Med*, 369(2): [http://doi: 10.1056/NEJMoa1303611](http://doi:10.1056/NEJMoa1303611).
80. Bernard V, Kherra S, Francou B et al (2017). Familial multiplicity of estrogen insensitivity associated with a loss of function ESR1 mutation. *J Clin Endocrinol Metab*, 102, 93-99.
81. Erika-Emoke M, Ghervan C, Hazi G, Dinca I (2009). Glucocorticoid resistance syndrome: treatment with ketoconazole, an efficient therapy solution – case report. *Endocrine Abstracts* 20P289.
82. Bansari G.P, Martin R, Yu J, Shu Y, Taylor R.N (2017). Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 96, 623-632.
83. Kamrath C, Hochberg Z, Hartmann M.F et al (2012). Increased activation of the alternative “Backdoor” pathway in patient with 21-hydroxylase deficiency: Evidence from urinary steroid hormone analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(3), 367-375.

84. Homma K, Hasegawa T, Nagai T et al (2006). Urine steroid hormone profile analysis in Cytochrome P450 Oxidoreductase deficiency: Implication for the backdoor pathway to dihydrotestosterone. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 2643-2649.
85. Kamrath C, Michaela F, Claudia H, Wudy SA (2016). Diagnosis of 21-hydroxylase deficiency by urinary metabolite ratios using gas chromatography-mass spectrometry analysis: reference values for neonates and infants. *Journal of steroid biochemistry & molecular biology*, 156, 10-16.
86. Honour J.W, Jones R, Leary S et al (2007). Relationships of urinary adrenal steroid at age 8 years with birth weight, postnatal growth, blood pressure, and glucose metabolism. *J of Clin Endocrinol Metab*, 92, 4340-4345.
87. Timon R, Olcina G, Carus PT, Raimundo A, Maynar J.I, Maynar M (2012). Urinary endogenous steroids and their relationships with BMD and body composition in healthy young males. *Endocrine*. [http://Doi 10.1007/s12020-012-9604-4](http://doi.org/10.1007/s12020-012-9604-4).
88. Honour J.W and Brook C.G.D (1997). Clinical indications for the use of urinary steroid profiles in neonates and children. *Ann Clin Biochem*, 34, 45-54.
89. Honour J.W (2001). Urinary steroid profile analysis. *Clinica Chimica Acta*, 313, 45-50.
90. Honour J.W (2009). Diagnosis of diseases of steroid hormone production, metabolism and action. *J Clin Res Ped Endo*, 1, 209-226.
91. Raynolds R.M, Shakerdi L.A, Sandhu K et al (2005). The utility of three different methods for measuring urinary 18-hydroxycortisol in the differential diagnosis of suspected primary hyperaldosteronism, *European Journal of Endocrinology*, 152, 903-907.

92. Ulick S, Levine L.S, Gunczler P et al (1979). A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 757-763.
93. New M.I and Willson R.C (1999). Steroid disorders in children: Congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *PNAS*, 96(22), 12790-12797
94. Kerkhofs T.M.A, Kerstens M.N, Kema I.P, Willems T.P, Haak H.R (2015). Diagnostic value of urinary steroid profiling in the evaluation of adrenal tumors. *Horm Canc*, 6, 168-175.
95. Tiu S.C, Chan A.O, Taylor N.F (2009). Use of urinary steroid profiling for diagnosing and monitoring adrenocortical tumours, *Hong Kong Med J*, 15, 463-470.
96. Sone M, Shibata H, Homma K, Tamura N et al (2009). Close examination of steroidogenesis disorders in a DOC and progesterone producing adrenocortical carcinoma. *Endocr*, 35, 25-33.
97. Suzuki T, Ueki M, Sakuta H, Fujisaki M et al (2003). Newly identified steroid hormone in urine of patients with Cushing syndrome: 3 α , 11 β -Dihydroxy-4-Androsten-17-one. *Endocrine Journal*, 50, 571-577.
98. Chung B.C, Choo H.Y.P, Kim T.W et al (1990). Analysis of anabolic steroid using GC/MS with selected ion monitoring. *Journal of Analytical Toxicology*, 14, 91-95.
99. Roberta J Ward, Shackleton C.H.L, Lawson A.M (1998). Gas chromatographic- mass spectrometric methods for the detection and identification of anabolic drugs. Division of Clinical chemistry, *Clinical research centre*, 93-97.

100. Yoon J.M, Lee K.H (2001). Gas chromatography and mass spectrometric analysis of conjugated steroids in urine. *J Bioci*, 26, 627-634.
101. Aguilera R, Thomas E.C, Catlin D.H (2000). A rapid screening assay for measuring urinary androsterone and etiocholanolone $d^{13}C$ (%) values by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 14, 2294-2299.
102. Yilmaz B (2015). GC/MS and HPLC methods for determination of Estriol hormone in pharmaceutical preparations. *Austin J Anal Pharm Chem*, 2, 1054-1058.
103. Jeffrey G. McDonald, Matthew S, Auchus R.J (2011). Steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-mass spectrometry for adrenal diseases. *Horm Cancer*, 2(6), 324-332.
104. Nguyễn Thu Nhạn (1973). Dây thì sinh dục sớm ở trẻ em. *Nội san Nhi khoa, Tạp chí Nhi Khoa*, 197, 43-53.
105. Nguyễn Thu Nhạn (1982). Một trường hợp hội chứng tuyến tùng ở trẻ em. *Nội san Nhi Khoa, Tạp chí Nhi Khoa*, 19-31.
106. Võ Thị Kim Huệ (1998). Chẩn đoán và theo dõi điều trị bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thiếu men 21-hydroxylase ở trẻ em Việt Nam. *Y học thực hành*, 12, 42-44.
107. Ngô Thị Thu Hương (2010). *Nghiên cứu giá trị 17-hydroxyprogesteron trong theo dõi điều trị bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu enzyme 21-hydroxylase ở bệnh viện Nhi trung ương*. Luận văn thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
108. Nguyễn Phú Đạt, Ngô Thị Thu Hương (2011). Giá trị của 17-hydroxyprogesterone để theo dõi điều trị bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu enzym 21-hydroxylase. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 1, 4-7.

109. Nguyễn Thúy Giang, Nguyễn Phú Đạt (2011). Kết quả điều trị tăng sản thượng thận bẩm sinh và một số yếu tố ảnh hưởng. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 74 (3), 102-106.
110. Nguyễn Phú Đạt, Nguyễn Thị Yến (2012). Suy thượng thận cấp ở người bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 80(3A), 10-16.
111. Võ Thị Kim Huệ (1999). Phát hiện đột biến mất đoạn ở người bệnh mắc bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh bằng kỹ thuật PCR. *Y học thực hành*, 4 (364), 47-48.
112. Thái Thiên Nam (2001). *Phát hiện đột biến gen CYP21 trong tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu enzyme 21-hydroxylase ở trẻ em*. Luận văn thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
113. Trần Kiên Hào (2007). Đặc điểm kiểu gen, kiểu hình và người lành mang gen bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thiếu enzyme 21-hydroxylase. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 55 (6), 109-115.
114. Vũ Chí Dũng, Nguyễn Phú Đạt (2011). Tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu 21-hydroxylase và u vỏ thượng thận. *Y học Việt Nam*, 2 (383), 21-25.
115. Nguyễn Thị Phương Mai, Nguyễn Thu Hiền, Ngô Diễm Ngọc, Vũ Chí Dũng và cộng sự (2017). Áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong phát hiện đột biến gene CYP11B1 gây bệnh thiếu hụt 11 β -hydroxylase. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 461, 172-175.
116. Maki Igarashi, Vu Chi Dung, Erina Suzuki, Shinobu Ida et al (2013). Cryptic genomic rearrangements in three patients with 46,XY disorders of sex development. *PLOS one*, 8 (7), e681194.
117. Kulle A, Krone N, Holterhus P.M et al (2017). Steroid hormone analysis in diagnosis and treatment of DSD: position paper of EU COST action BM 1303 'DSDnet'. *European Journal of Endocrinology*, 176, 1-9.

118. Intersex society of North America (2006). Clinical guidelines for the management of disorders of sex development in childhood. Funded by The California Endowment and Arcus Foundation.
119. Homma K, Hasegawa T, Masumoto M, Takeshita E, Wantanabe K et al (2003). Reference values for urinary steroids in Japanese newborn infants: Gas chromatography/Mass spectrometry in selected ion monitoring, *Endocrine Journal*, 50, 783-792.
120. Martin Bland J, Altman Douglas G (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 307-310.
121. Weykamp C.W, Penders T.J, Schmidt N.A, Borburgh A.J, van de Calseyde JF, Wolthers BJ (1989). Steroid profile for urine: Reference values. *Clin Chem*, 35(12), 2281-2284.
122. Nguyễn Thu Nhân, Cao Quốc Việt, Nguyễn Phú Đạt, Nguyễn Nguyệt Nga, Nguyễn Thị Hoàn, Võ Kim Huệ (1990). Tuổi dậy thì ở trẻ em. *Tạp chí Nhi Khoa*, 1, 43-47.
123. 17 α -OH Progesterone, User's manual. Tài liệu hướng dẫn sử dụng kit định lượng 17OHP của hãng DRG Instruments GmbH, Germany.
124. Eggers S, Sadedin S, van den Berge J.A, Robevska G, Ohnesorg T, Vu Chi Dung, Andrew H. Sinclair et al (2016). Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biology*, 17, 243-263.
125. Kon M, Suzuki E, Dung V.C, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K et al (2015). Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Human Reproduction*, 30, 499-506.

126. Sasaki G, Ogata T, Ishii T et al (2015). Micropenis and the 5 α -reductase-2 (SRD5A2) gene: Mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. *The Journal of clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(7), 3431-3436.
127. Donadille B, Houang M, Netchine I et al (2018). Human 3 beta hydroxysteroid dehydrogenase deficiency associated with normal spermatic numeration despite a severe enzyme deficit. *Endocrinology and European society of Endocrinology*, <http://Doi: 10.1530/EC-17-0306>.
128. Vitor F.B de Araujo, Renata S de Oliveira, Kallianna P.D.G et al (2014). 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II deficiency on newborn screening test. *Arq Bras Endocrinology Metab*, 58, 650-664.
129. Nguyễn Thị Phượng (1992). Đặc điểm lâm sàng của hội chứng Turner thể khảm 45,X/46,XX; 45,X/47,XXX; 45,X/46,XX/47,XXX. *Tạp chí Nhi Khoa*, 79-82.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Phiếu tình nguyện tham gia đề tài nghiên cứu.

Phụ lục 2a: Phiếu điều tra dành cho trẻ khỏe mạnh.

Phụ lục 2b: Phiếu điều tra dành cho người bệnh nghi mắc TSTTBS, RLPTGT.

Phụ lục 3: Kết quả xét nghiệm GC/MS định lượng steroid niệu.

Phụ lục 4: Danh sách bệnh nhân nghiên cứu lấy mẫu tại Bệnh viện Nhi Trung ương.

Phụ lục 5: Danh sách bệnh nhân nghiên cứu lấy mẫu tại Bệnh viện Việt Đức.

Phụ lục 6: Kết quả phân tích gen người bệnh thuộc đề tài.

Phụ lục 7: Một số hình ảnh người bệnh TSTTBS, RLPTGT.

Phụ lục 8: Giá trị tham chiếu xét nghiệm 17-hydroxyprogesterone.

PHIẾU TÌNH NGUYỆN THAM GIA ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU

Họ và tên đối tượng NC:.....

Giới tính:, sinh ngày:.....

Địa chỉ:.....

Họ và tên người được phỏng vấn:

Điện thoại:.....

Mối quan hệ với đối tượng NC:.....

Sau khi được nghe giải thích về ý nghĩa, tầm quan trọng, quyền lợi, nghĩa vụ cũng như những nguy cơ tiềm tàng và lợi ích mà đối tượng nghiên cứu có được khi tham gia đề tài: **“Nghiên cứu định lượng steroid niệu bằng GC/MS trong chẩn đoán rối loạn sinh tổng hợp steroid bẩm sinh ở trẻ em”**. Tôi tự nguyện tham gia nghiên cứu, tôi đồng ý lấy mẫu nước tiểu của đối tượng nghiên cứu để làm xét nghiệm.

Ngày.....tháng.....năm.....

Họ và tên người được phỏng vấn

(Ký và ghi rõ họ tên)

Phụ lục 2a:

Mã NC:.....

PHIẾU ĐIỀU TRA DÀNH CHO TRẺ KHỎE MẠNH

Họ và tên:.....

Giới tính:.....

Ngày sinh:.....

Họ và tên người được phỏng vấn:.....

Địa chỉ:.....

Điện thoại:.....

Mối quan hệ với đối tượng NC:.....

Khi sinh, trẻ cân nặng:..... Tuổi thai:..... tuần.

Trẻ hiện khỏe mạnh không? Có Không

Trong vòng 1 tháng qua, trẻ có mắc bệnh gì không? Có Không

Nếu có, trẻ có được dùng thuốc không? Có Không

Nếu có là loại gì?.....

Trong gia đình, họ hàng có người nào mắc bệnh bất thường về giới tính

(TSTTBS, RLPTGT) không? Có Không

Nếu có là ai:.....

Thời điểm lấy mẫu:.....

Chiều cao hiện tại: Cân nặng hiện tại:.....

Người phỏng vấn

Phụ lục 2b:

Mã NC:.....

**PHIẾU ĐIỀU TRA DÀNH CHO NGƯỜI BỆNH
NGHI MẮC TSTTBS, RLPTGT**

Phần A: Thông tin hành chính:

Họ và tên người bệnh:.....

Sinh ngày:..... Giới tính: Nam/ Nữ.

Địa chỉ:

Họ và tên người được phỏng vấn:

Mối quan hệ với BN:

Điện thoại liên hệ:

Ngày vào viện:..... Số bệnh án:

Phần B: Thông tin lâm sàng

Ngày thăm khám trẻ, tại địa điểm:.....

Chẩn đoán:.....

Thời điểm chẩn đoán:

Điều trị:

Đặc điểm khi sinh:.....

Sự phát triển:

Tiền sử gia đình:.....

Khám lâm sàng hiện tại: Cao..... cân nặng.....

Đặc điểm giới tính:.....

.....

Các dấu hiệu khác:.....

C: Kết quả xét nghiệm

Ngày xét nghiệm.....

Na⁺ (mmol/L):..... K⁺ (mmol/L).....

Kết quả miễn dịch: 17-OHP Testosterone: FSH..... LH.....

Xét nghiệm khác:

Người thực hiện

Phụ lục 3:

Mã NC:.....

KẾT QUẢ ĐỊNH LƯỢNG STEROID NIỆU BẰNG GC/MS

Họ và tên người bệnh: Giới tính:

Tuổi/ Ngày sinh:.....

Địa chỉ:.....

Ngày lấy mẫu:

Chẩn đoán:.....

Xét nghiệm:.....

KẾT QUẢ GC/MS

STT	Steroids	Nồng độ (μmol/L)	Nồng độ (μmol/mol creatinin)	Nhận xét
1	Androsterone			
2	Etiocholanolone			
3	Dehydroepiandrosterone			
4	11 Keto androsterone			
5	11 OH Androsterone			
6	11 OH Etiocholanolon			
7	Prenandiol			
8	Prenantriol			
9	Androstentriol			
10	Tetrahydrocortisone			
11	Tetrahydrocortisol			
12	5α-Tetrahydrocortisol			
13	a- Cortolone			
14	b - Cortol			
15	b- Cortolone			
16	a-Cortol			
17	THS			

Creatinin niệu: mmol/L

Nhận xét:

Kết luận:.....

Ngày xét nghiệm

Phụ lục 6:

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH GEN NGƯỜI BỆNH THUỘC ĐỀ TÀI

Mã NC	Họ và tên	GC/MS	Gen	Đột biến
VN03	Ng Văn Hoàng A	21-OH	CYP21A2	DHT đột biến mất đoạn 30KB c.515T>A (p.Ile172Asn)
VN08	Phạm Bảo N	21-OH	CYP21A2	DHT đột biến đảo đoạn Promoter. DHT g.655A/C>G
VN17	Phạm Trang L	21-OH	CYP21A2	ĐHT đột biến mất đoạn 30KB
VN20	Phạm Vy O	21-OH	CYP21A2	DHT p.P459L DHT p.P30L
VN22	Thân Thị H	21-OH	CYP21A2	ĐHT c.737delA
VN26	Đặng Phúc Đ	21-OH	CYP21A2	ĐHT g.655A/C>G
VN28	Nguyễn Thu Tr	21-OH	CYP21A2	DHT đảo đoạn promoter DHT g.113G>A, g.110T>C
VN30	Ng Công Huy Tr	21-OH	CYP21A2	DHT g.655A/C>G DHT g.2108C>T (p.Arg356Trp)
VN33	Chu Thị H	21-OH	CYP21A2	DHT đột biến mất đoạn 30KB c.515T>A (p.Ile172Asn)
VN43	Cao Lung L (Cao Thị Hòa A)	21-OH	CYP21A2	ĐHT c.515T>A (p.Ile172Asn)
VN44	Lữ Thị Yến Nh	21-OH	CYP21A2	DHT đột biến mất đoạn 30KB DHT c.515T>a (p.Ile172Asn)
VN45	Lê Mạnh H	21-OH	CYP21A2	ĐHT đột biến mất đoạn 30KB
VN46	Hoàng Như V	21-OH	CYP21A2	DHT c.368C>T (p.Thr123Ile)
VN51	Phạm Gia H	21-OH	CYP21A2	DHT đột biến đảo đoạn Promoter. ĐHT g.655A/C>G
VN54	Ngô Khánh V	21-OH	CYP21A2	DHT đột biến mất đoạn 30KB DHT c.328_335delGAGACTAC
VN57	Ng Minh Ch	21-OH	CYP21A2	ĐHT đột biến mất đoạn 30KB
VN58	Phùng Thị Y	21-OH	CYP21A2	ĐHT c.515T>a (p.Ile172Asn)
VN61	Ng Thị Kiều Ng	21-OH	CYP21A2	ĐHT c.515T>a (p.Ile172Asn)

VN62	Hà Thị V	21-OH	CYP21A2	ĐHT c.515T>A (p.Ile172Asn)
VN80	Trần Thị Minh Ng	21-OH	CYP11B1 CYP21A2	DHT c.128G>A (p.Arg43Gln) DHT c.515T>A (p.Ile172Asn)
VN85	Nguyễn Vũ Thanh V	21-OH	CYP21A2	DHT đột biến mất đoạn 30KB DHT c.515T>A (p.Ile172Asn)
VN88	Nguyễn Hồng K	21-OH	CYP21A2	ĐHT đột biến mất đoạn 30KB
VN90	Nguyễn Bá Bảo M	21-OH	CYP21A2	ĐHT c.515T>A (p.Ile172Asn)
VN95	Phạm Thị Út Tr	21-OH	CYP21A2	ĐHT đột biến mất đoạn 30KB
VN97	Đình Xuân L	21-OH	CYP21A2	DHT c.140A>G (p.Tyr47Cys)
VN98	Vương Xuân L	21-OH	CYP21A2	ĐHT p.R356W
VN99	Vương Thị Nh	21-OH	CYP21A2	ĐHT p.R356W
VN110	Hà Thái Kh	Chưa XD	CYP21A2	Không phát hiện đột biến
VN111	Lê Tuệ A	Chưa XD	CYP21A2	Không phát hiện đột biến
VN112	Nguyễn Đức Tr	Chưa XD	CYP21A2	Không phát hiện đột biến
VN113	Trịnh Duy H	Chưa XD	CYP21A2	Không phát hiện đột biến
VN114	Đoàn Gia H	Chưa XD	CYP21A2	Không phát hiện đột biến
VN115	Hoàng Hữu B	Chưa XD	CYP21A2	Không phát hiện đột biến
VN116	Lê Thị B (An L)	Chưa XD	CYP21A2	Không phát hiện đột biến
VN117	Lò Minh H	Chưa XD	CYP21A2	Không phát hiện đột biến
VN101	Khuất Thế A	11 β -OH	CYP11B1	ĐHT c.128G>A (p.Arg43Gln)
VN102	Nguyễn Thiên T	11 β -OH	CYP11B1	DHT c.128G>A (p.Arg43Gln) DHT c.1157C>T (p.Ala386Val)
VN103	Trần Hải Đ	Chưa XD	CYP11B1	DHT c.128G>A (p.Arg43Gln)
VN100	Nguyễn Việt H	11 β -OH	CYP11B1	DHT c.128G>A (p.Arg43Gln)
VD11	Nguyễn Gia B	5 α - reductase	SRD5A2	DHT c.362G>A (Gly>Glu) DHT c.680G>A (p.Arg227Gln)
VD12	Nguyễn Việt H	5 α - reductase	SRD5A2	DHT c.674G>A (p.Gly>Glu) ĐHT c.680G>A (p.Arg227Gln)
VD13	Đỗ Tiên Th	5 α - reductase	SRD5A2	ĐHT c.265G>C (p.Val89Leu) ĐHT c.680G>A (p.Arg227Gln)

VD14	Đỗ Tiến Thg	5 α - reductase	SRD5A2	ĐHT c.265G>C (p.Val89Leu) ĐHT c.680G>A (p.Arg227Gln)
VD15	Trần Nguyễn H	5 α - reductase	SRD5A2	ĐHT c.265G>C (p.Val89Leu) DHT c.680G>A (p.Arg227Gln) DHT c.590A>G (p.Glu197Gly)
VD16	Trần Anh V	5 α - reductase	SRD5A2	ĐHT c.265C>G (p.Leu89Val) DHT c.680G>A (p.Arg227Gln) DHT c.590A>G (p.Glu197Gly)
VD17	Đỗ Đăng Qu	5 α - reductase	SRD5A2	DHT c.362G>A (p.Gly >Glu) DHT c.607G>A (p.Gly203Ser)
VN107	Vi Thị Th	5 α - reductase	SRD5A2	ĐHT c.265G>C (p.Val89Leu) DHT c.607G>A (p.Gly203Ser) DHT c.239G>T (p.Gly80Val)

ĐHT: đồng hợp tử

DHT: dị hợp tử

Chưa XD: chưa xác định

21-OH: thiếu 21-hydroxylase

11-OH: thiếu 11 β -hydroxylase

5 α -reductase: thiếu 5 α -reductase type 2

Phụ lục 7:

HÌNH ẢNH NGƯỜI BỆNH THUỘC ĐỀ TÀI



Hình 1: Người bệnh TSTTBS thiếu 21-OH sơ sinh, không phân biệt giới tính



Hình 2: Người bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH (6 tuổi, nữ)



Hình 3: Người bệnh thiếu 21-OH nam hóa hoàn toàn (17 tuổi, NST 46,XX)



Hình 4: Người bệnh nam, 2 tuổi thiếu 11β -OH có dấu hiệu dậy thì sớm



Hình 5: Hình ảnh người bệnh (nam 3 tuổi), thiếu 5α -reductase type 2



Hình 6: Hình ảnh người bệnh (nam, 11 tuổi), thiếu 5α -reductase type 2



Hình 7: Người bệnh 13 tuổi, thiếu 5 α -reductase type 2

Phụ lục 8.

Bảng 1. Khoảng tham chiếu nồng độ 17-OHP

Độ tuổi	Nồng độ 17-OHP (ng/mL) *	
	Nam	Nữ
< 1 tháng	2,4-16,8	0,0-8,0
< 2 tháng	3,6-13,7	1,6-9,7
< 3 tháng	1,7-4,0	0,1-3,1
3-14 tuổi	0,07-1,7	0,07-1,7
Người trưởng thành	0,5-2,1	0,1-2,3

* Khoảng tham chiếu nồng độ 17-OHP do hãng DRG cung cấp trong hướng dẫn của thuốc thử [123].