

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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI – 2019

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

**Người hướng dẫn khoa học: 1. TS. Trần Thị Chi Mai
2. PGS.TS. Trần Minh Điền**

Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Thị Hà

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Nghiêm Luật

Phản biện 3: PGS.TS. Nguyễn Phú Đạt

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường
Họp tại Trường Đại học Y Hà Nội.

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2019

Có thể tìm hiểu luận án tại các thư viện:

- Thư viện Quốc gia;
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội;

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài.

Rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid bẩm sinh là nhóm bệnh lý do giảm một phần hoặc hoàn toàn hoạt tính của enzym xúc tác phản ứng tổng hợp hormon steroid gây tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS), rối loạn phát triển giới tính (RLPTGT), rối loạn điện giải. Trong đó, nguyên nhân thường gặp gây TSTTBS là thiếu 21-hydroxylase (21-OH), thiếu 11 β -hydroxylase (11 β -OH), nguyên nhân thường gặp gây RLPTGT là thiếu 5 α -reductase type 2. Thiếu các enzym khác như thiếu 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II (3 β -HSD II), 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 nhưng hiếm gặp. Việc chẩn đoán sớm và điều trị kịp thời cho những bệnh nhân từ sơ sinh là rất quan trọng giúp giảm tỷ lệ biến chứng và tử vong. Định lượng steroid niệu bằng sắc ký khí - khối phổ (GC/MS: Gas chromatography-mass spectrometry) giúp chẩn đoán xác định nhiều nguyên nhân thiếu hụt enzym khác nhau gây rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid. Kỹ thuật này được áp dụng từ hơn 35 năm qua trên thế giới nhưng chưa được áp dụng tại Việt Nam. Số lượng bệnh nhân mắc TSTTBS, RLPTGT tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 1999 đến 2016 là 842 người bệnh, nên cần triển khai kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS giúp chẩn đoán và theo dõi điều trị. Kỹ thuật mới nên cần thẩm định phương pháp, xây dựng khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ em trước khi ứng dụng vào chẩn đoán cho người bệnh mắc rối loạn tổng hợp hormon steroid được chẩn đoán TSTTBS, RLPTGT.

2. Mục tiêu của đề tài.

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

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

3. Địa điểm thực hiện đề tài

Đề tài thực hiện tại khoa Hóa sinh – Bệnh viện Nhi Trung ương.

4. Đóng góp mới của đề tài

Kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS được triển khai lần đầu tại Việt Nam, các tiêu chí thẩm định phương pháp đáp ứng yêu cầu kỹ thuật về độ chính xác và độ xác thực. Khoảng tham chiếu cho 17 steroid niệu và 8 tỷ lệ chẩn đoán được xác định cho trẻ từ sơ sinh đến ≤ 11 tuổi. Dựa vào kỹ thuật này đã chẩn đoán cho 126/200 người bệnh mắc thiếu 21-OH, 11 β -OH, 3 β -HSD II, 5 α -reductase type 2 trong đó nhiều người bệnh được khẳng định bằng phân tích đột biến gen tương ứng.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.

Nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn cao góp phần cung cấp một kỹ thuật chẩn đoán hiện đại ngang tầm quốc tế đáp ứng yêu cầu chẩn đoán bệnh rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid và đã áp dụng thường quy từ năm 2018 trong chẩn đoán cho người bệnh.

Nghiên cứu có ý nghĩa khoa học với bộ cục chặt chẽ, phương pháp xử lý số liệu phù hợp, thực hiện theo quy chuẩn quốc tế về triển khai kỹ thuật mới với nội dung thẩm định phương pháp, thiết lập khoảng tham chiếu, ứng dụng tiêu chuẩn này trong chẩn đoán bệnh lý tăng sản thượng thận bẩm sinh, rối loạn phát triển giới tính.

Đề tài có tính sáng tạo, tính mới và cập nhật, lần đầu tiên triển khai thành công kỹ thuật định lượng steroid niệu tại Việt Nam, quy trình được thay đổi cho phù hợp với điều kiện hiện có của phòng xét nghiệm.

4. Cấu trúc luận án.

- Luận án được trình bày trong 136 trang (không kể tài liệu tham khảo và phụ lục). Luận án chia làm 7 phần: Đặt vấn đề 2 trang; chương 1: Tổng quan tài liệu 40 trang; chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 16 trang; chương 3: Kết quả nghiên cứu 46 trang; chương 4: Bàn luận 29 trang; Kết luận 2 trang; Khuyến nghị 1 trang.

- Luận án gồm 34 bảng, 34 biểu đồ, hình và sơ đồ, có 129 tài liệu tham khảo, trong đó có 20 tài liệu tiếng Việt và 109 tài liệu tiếng Anh. Phần phụ lục gồm: Hình ảnh bệnh nhân, mẫu tự nguyện tham gia nghiên cứu, phiếu điều tra; kết quả phân tích gen; danh sách bệnh nhân tham gia nghiên cứu.

Chương 1: TỔNG QUAN

1. Kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC-MS

Định lượng steroid niệu bằng kỹ thuật sắc ký khí – khối phổ sử dụng ion chọn lọc (GC/MS-SIM) được áp dụng trên thế giới từ những năm 1980 đến nay trong chẩn đoán các bệnh rối loạn sinh tổng hợp hormon

steroid bẩm sinh. Kỹ thuật có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, mẫu bệnh phẩm là nước tiểu nên phù hợp với mọi đối tượng đặc biệt là trẻ em. Mỗi bệnh lý thiếu hụt enzym có mẫu hình sắc ký đồ đặc trưng do có hiện tượng thiếu hormon thành phẩm và tăng tiền chất ở vị trí trước của enzym bị thiếu hụt. Dựa vào nồng độ các steroid niệu so với khoảng tham chiếu và các tỷ lệ chẩn đoán giữa tiền chất và hormon để chẩn đoán xác định và phân biệt các bệnh rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid khác nhau như thiếu 21-OH, thiếu 11 β -OH, 3 β -HSD II, thiếu 5 α -reductase type 2 và các bệnh thiếu 17-OH, thiếu Cyt P450 oxidoreductase (POR), thiếu corticosterone methyl oxidase II ...

Quy trình được xây dựng dựa theo kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS của Honour JW. Thủy phân steroid niệu liên hợp bằng enzym glucuronidase/sulphatase, tách chiết steroid tự do bằng cột Bond Elut-C18, tạo dẫn xuất steroid lần lượt với methoxyamine và trimethylsilylimidazole trước khi tách chiết bằng Iso-octan để phân tích trên máy sắc ký khí khối phổ. Kỹ thuật định lượng steroid niệu lần đầu được triển khai tại Việt Nam nên cần được thẩm định phương pháp và thiết lập khoảng tham chiếu cho trẻ khỏe mạnh theo các hướng dẫn quốc tế nhằm đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Các thông số cần thẩm định cho kỹ thuật định lượng steroid niệu bao gồm độ chụm (độ lặp lại và độ tái lập), độ thu hồi, giới hạn định lượng, độ chính xác.

2. Bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid

Thiếu hụt bất kỳ enzym nào tham gia quá trình sinh tổng hợp hormon steroid cũng gây rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid, gây ra tăng sản thượng thận bẩm sinh, rối loạn nước điện giải, rối loạn phát triển giới tính. Trong đó thiếu enzym 21-OH là nguyên nhân thường gặp nhất, chiếm hơn 90% các trường hợp TSTTBS, thiếu 11 β -OH đứng thứ 2 chiếm 5-8%, thiếu 3 β -HSD II và các enzym khác là nguyên nhân hiếm gặp gây TSTTBS, RLPTGT. Thiếu enzym 5 α -reductase type 2 gây giảm tổng hợp 5 α -dihydrotestosterone gây nữ hóa trẻ nam là một trong hai nguyên nhân thường gặp nhất gây RLPTGT ở trẻ nam có nhiễm sắc thể 46,XY. Định lượng 17-OHP bằng kỹ thuật miễn dịch giúp sàng lọc nhằm phát hiện các trường hợp TSTTBS điển hình do thiếu 21-OH, thiếu 11 β -OH, tuy nhiên không thể phát hiện các trường hợp TSTTBS và RLPTGT phức tạp khác do thiếu 3 β -HSD II, thiếu Cyt P450 oxidoreductase (POR), 5 α -reductase type 2, AME (apparent mineralocorticoid excess). Đồng thời sử dụng 17-OHP trong chẩn đoán cũng có thể dương tính giả ở trẻ sơ sinh thiếu tháng, nhẹ cân và không phân biệt các thể gây TSTTBS.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Nhóm chứng:

Gồm 269 trẻ bình thường từ 1 ngày đến ≤ 11 tuổi, chia làm 4 nhóm:

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 không có các dấu hiệu bất thường của tăng sản thượng thận bẩm sinh, rối loạn phát triển giới tính. Sơ sinh đủ tháng theo tiêu chuẩn của WHO với tuổi thai 37-42 tuần, cân nặng khi sinh $> 2500g$, Tiền sử gia đình không có người mắc bệnh trên. Mẫu được thu thập tại khoa Sản Bệnh viện Đa khoa tỉnh Vĩnh Phúc, trung tâm y tế xã hoặc phường khi trẻ đến tiêm chủng, các trường mẫu giáo, tiểu học trên địa bàn tỉnh Vĩnh Phúc và thành phố Hà Nội.

Tiêu chuẩn loại trừ: gia đình và hoặc trẻ không đồng ý tham gia nghiên cứu, trẻ có một trong các dấu hiệu lâm sàng nghi ngờ mắc TSTTBS hoặc RLPTGT hoặc được điều trị corticoid trong vòng 1 tháng.

2.1.2. Nhóm bệnh:

Gồm 200 người bệnh nghi mắc rối loạn sinh tổng hợp steroid được chẩn đoán TSTTBS, RLPTGT bởi các bác sỹ Nội tiết-Chuyển hóa-Di truyền, nhi khoa.

Địa điểm: khoa Nội tiết –Chuyển hóa –Di truyền Bệnh viện Nhi Trung ương và khoa Phẫu thuật Nhi- Bệnh viện Hữu Nghị Việt Đức.

Thời gian lấy mẫu: từ tháng 10/2015 đến tháng 7/2018.

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

Mắc TSTTBS: Tiêu chuẩn lâm sàng dựa vào công bố của New MI: bộ phận sinh dục không rõ ràng, không phân biệt được nam và nữ do phì đại âm vật giống dương vật; dấu hiệu dậy thì sớm ở trẻ trai; dấu hiệu mất nước, suy thượng thận, sạm da ở cả nam và nữ.

Mắc rối loạn phát triển giới tính theo phân loại Chicago 2006: khi có triệu chứng bất thường ở bộ phận sinh dục như dương vật nhỏ, lỗ đái thấp, âm tinh hoàn, không có dương vật, bìu chẻ đôi và giống với bộ phận sinh dục nữ. Nữ hóa ở người có ngoại hình nam như vú phát triển, có kinh nguyệt, dấu hiệu vô kinh tiên phát ở người ngoại hình nữ...

Gia đình và/hoặc bệnh nhân nghi ngờ mắc TSTTBS và RLPTGT chấp thuận và ký cam kết tự nguyện tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: bệnh nhân và/hoặc gia đình không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Bệnh nhân rối loạn điện giải đơn thuần do bệnh lý toàn thân, cơ quan tiêu hóa mà không có các dấu hiệu lâm sàng TSTTBS, RLPTGT.

Bệnh nhân rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid mắc phải như hội chứng Cushing do thuốc, Addison, khối u tuyến thượng thận.

Bệnh phẩm: mẫu nước tiểu ngẫu nhiên bảo quản được 2 tuần ở 2-8°C, được 6 tháng ở -20°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Quy trình định lượng steroid niệu:

Thủy phân steroid liên hợp trong nước tiểu bằng enzym glucuronidase và sulphatase ở 37°C qua đêm. Tách chiết steroid tự do qua cột Bond Elut, rửa giải bằng methanol và làm khô bằng khí ni tơ ở 70°C.

Tạo dẫn xuất steroid với methoxyamine ở 80°C trong 1,5 giờ và tạo dẫn xuất với trimethylxylimidazole ở 110°C trong 3,5 giờ. Tách chiết steroid sau khi tạo dẫn xuất bằng Iso-octan được mẫu sử dụng để bơm tự động vào hệ thống GC/MS.

Trong máy sắc ký khí khối phổ: mẫu được làm bay hơi ở nhiệt độ cao tại cửa tiêm mẫu trước khi được sắc ký khí nhằm phân tách các steroid dựa theo ái lực khác nhau với pha tĩnh. Sau khi sắc ký chuyển mẫu đến bộ phận ion hóa các phân tử steroid được bắn phá thành các mảnh ion đặc trưng cho cấu trúc phân tử mỗi steroid. Các ion chọn lọc đến bộ đếm được phát hiện nhờ cảm biến và vẽ thành sắc ký đồ. Dựa vào nồng độ steroid đã biết trong mẫu chuẩn, thiết lập đường chuẩn và tính nồng độ steroid trong mẫu thử nhờ phần mềm Chem Station. Xác định các steroid trong mẫu thử dựa vào thời gian lưu và ion đặc hiệu cho từng steroid được công bố.

Các bước tiến hành đề tài:

Bước 1: thẩm định phương pháp định lượng steroid niệu bằng GC/MS dựa theo hướng dẫn của Westgard với các nội dung: xác định giới hạn định lượng, độ thu hồi, độ lặp và tái lặp, độ chính xác thông qua so sánh kết quả với giá trị trung vị của 28 phòng xét nghiệm tham gia ngoại kiểm quốc tế SKML.

- Bước 2: thiết lập khoảng tham chiếu steroid niệu ở trẻ em theo hướng dẫn của Hiệp hội Hóa sinh lâm sàng và phòng xét nghiệm Quốc tế IFCC/CLSI: đánh giá sự phân bố từng steroid niệu, tính tỷ lệ chẩn đoán. Thiết lập khoảng tham chiếu nồng độ và tỷ lệ chẩn đoán cho nam và nữ trong mỗi nhóm tuổi (nếu không khác biệt sẽ thiết lập chung cho cả nam và nữ). Khoảng tham chiếu tính theo phương pháp phi tham số với dữ liệu phân bố không chuẩn. Xấp xỉ 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.

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

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

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.

- Bước 3: thiết lập tiêu chuẩn chẩn đoán và áp dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu trong chẩn đoán và theo dõi điều trị các rối loạn sinh tổng hợp steroid ở bệnh nhân nghi mắc TSTTBS, RLPTGT.

Tiêu chuẩn chẩn đoán được thiết lập cho một số bệnh lý thiếu enzym tổng hợp steroid dựa theo nghiên cứu của Krone và cộng sự, Chan OK và cộng sự phù hợp với phương pháp định lượng steroid niệu bằng GC/MS được thiết lập.

Chẩn đoán **thiếu 21-OH** 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 tham chiếu.
- ✓ Tỷ lệ THS/ (THE+THF+5 α -THF) trong khoảng tham chiếu (tiêu chuẩn loại trừ mắc thiếu 11 β -OH có tăng nồng độ PT).

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

- ✓ Có sự xuất hiện rõ của 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 tham chiếu.

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

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

Chẩn đoán **thiếu 5 α -reductase type 2** khi có các tiêu chuẩn sau:

- ✓ Tỷ lệ 5 α -THF/THF thấp hơn khoảng tham chiếu hoặc tỷ lệ THF/5 α -THF cao hơn khoảng tham chiếu.
- ✓ Là bệnh nhân nam, có nhiễm sắc thể 46,XY, có dấu hiệu lâm sàng dương vật nhỏ, lỗ đái thấp, bìu chẻ đôi.

Tiêu chuẩn về tỷ lệ THF/5 α -THF cao hơn khoảng tham chiếu và có dấu hiệu nữ hóa ở trẻ nam (nhiễm sắc thể 46,XY) là bắt buộc.

- Bước 4: thu thập thông tin cận lâm sàng trong hồ sơ bệnh án.

2.3. Phân tích, xử lý số liệu. Sử dụng phần mềm Excell, SPSS 22.0, phần mềm so sánh phương pháp (Method validation) trong xử lý số liệu và so sánh phương pháp.

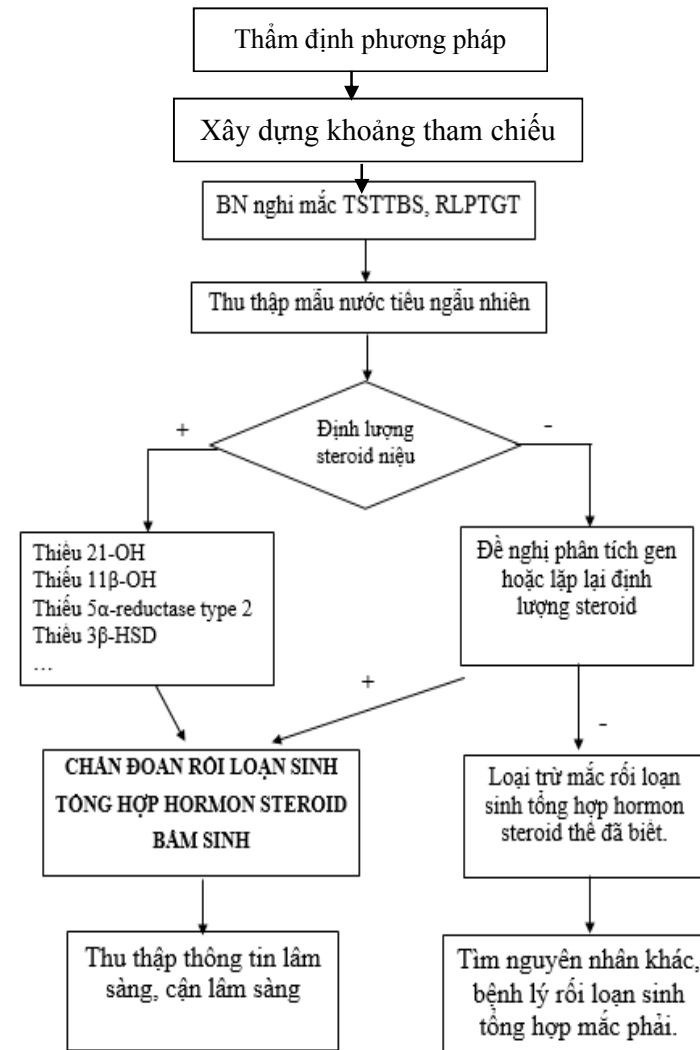
Giá trị $p < 0,05$ được coi là có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh.

So sánh trung vị của nồng độ steroid niệu giữa hai nhóm bằng kiểm định Mann Whithney, so sánh nhiều trung vị 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.

2.4. Đạo đức nghiên cứu. Nghiên cứu đã được thông qua bởi Hội đồng Đạo đức của trường Đại học Y Hà Nội, quyết định 187/HĐĐDDHYN ngày 20/02/2016. Các đối tượng nghiên cứu của nhóm chứng và nhóm bệnh cam kết đồng ý tham gia nghiên cứu, không mất phí xét nghiệm, được bảo mật thông tin.



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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

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

STT	Steroid niệu	Giới hạn định lượng ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)	Độ thu hồi (%)
1	An	0,11	13,18	102,5
2	Et	0,05	10,69	114,7
3	DHEA	0,10	17,84	113,3
4	11 keto An	0,12	8,36	111,1
5	11-OH An	0,07	19,3	112,0
6	11-OH Et	0,09	10,48	113,6
7	PD	0,07	14,64	100,0
8	PT	0,07	16,86	101,5
9	A'3	0,21	9,82	91,4
10	THE	0,16	11,28	112,7
11	THF	0,11	18,43	110,2
12	5 α -THF	0,11	18,07	106,3
13	α -Cortolone	0,09	8,32	91,3
14	β -Cortol	0,11	15,16	91,8
15	β -Cortolone	0,06	10,9	99,4
16	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 A'3 có giới hạn định lượng lần lượt là 0,27 và 0,21 ($\mu\text{mol/L}$) cao hơn các sản phẩm khác nhưng là steroid ít có giá trị trong chẩn đoán rối loạn tổng hợp steroid bẩm sinh.

Độ thu hồi các sản phẩm chuyển hóa steroid niệu đạt từ 90% đến 115%. Trung bình là $101,9 \pm 8,4\%$ ($\bar{X} \pm \text{SD}$)

Bảng 3.2. Kết quả độ lặp lại của phương pháp

Steroid	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	1,25	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%.

Độ lặp lại của các steroid niệu với 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 $4,7 \pm 2,7(\%)$ ($\bar{X} \pm \text{SD}$).

Bảng 3.3. Kết quả độ tái lập của phương pháp

Steroid	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 trộn bình thường là $12,85 \pm 1,24$ (%) và mẫu trộn bệnh lý là $14,86 \pm 1,4$ (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$).

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

Steroid	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

Các steroid niệu tương quan chặt chẽ với giá trị trung vị của các kết quả EQA với hệ số tương quan r đạt 0,970-0,999. 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. Các steroid niệu có sự tương đồng tốt với giá trị trung vị của kết quả ngoại kiểm (n=17).

3.2. Khoảng tham chiếu các steroid niệu ở trẻ em

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

Giới tính Nhóm tuổi	Nam		Nữ		p
	n	%	n	%	
Nhóm 1: 1-28 ngày	34	53,1	30	46,9	0,617
Nhóm 2: 1 tháng - <2 tuổi	31	50,8	30	49,2	0,898
Nhóm 3: 2 - < 8 tuổi	43	58,1	31	41,9	0,163
Nhóm 4: 8 - <11 tuổi	29	41,4	41	58,9	0,151
Tổng	137	50,9	132	49,1	0,243

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

Sự phân bố các sản phẩm chuyển hóa steroid niệu

Toàn bộ 16 thông số nồng độ steroid niệu đều không tuân theo quy luật chuẩn (Gaussian). So sánh dựa vào giá trị trung vị (median), giá trị thấp nhất (min), giá trị cao nhất (max). 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.

Nồng độ An, Et, 11OH An, 11OH Et rất thấp ở trẻ < 8 tuổi, tăng dần ở trẻ 8-11 tuổi. THE, THF, 5 α -THF tăng dần theo tuổi.

Bảng 3.6. Nồng độ các steroid niệu theo khoảng tuổi

Steroid	Giá trị trung vị (min-max) $\mu\text{mol}/\text{mmol creatinin}$				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 0,0-35	0,15 0,01-1,08	0,000
Et	0,01 0-0,43	0,0 0- 0,71	0,01 0- ,19	0,09 0,01-0,60	0,000
DHEA	0,14 0,01- 3,03	0,05 0- 1,29	0,02 0-0,01	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 - 1,32	0,06 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 -4,0	0,08 0,01-0,43	0,000
THS	0,01 0-0,20	0,01 0-0,71	0,01 0-0,10	0,01 0-0,04	0,000

*Kiểm định Kruskal-Wallis

Có sự khác biệt nồng độ các steroid niệu theo tuổi ($p \leq 0,001$).

Bảng 3.7. Khoảng tham chiếu steroid niệu

Steroid niệu	Khoảng tham chiếu steroid ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)			
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3	Nhóm 4
An	0 - 0,1	0 - 0,1	0 - 0,17	Nam: 0 - 0,38 Nữ: 0 - 0,86
Et	0 - 0,09	0 - 0,1	0 - 0,12	Nam: 0 - 0,29 Nữ: 0 - 0,46
DHEA	0,01 - 0,68	0 - 0,86	0 - 0,26	0,01 - 0,22
11 Keto-An	0,01 - 0,58	0 - 0,26	0 - 0,29	Nam: 0 - 0,39 Nữ: 0 - 0,45
11OH-An	0 - 0,20	0 - 0,70	0 - 0,28	0,01 - 0,52
11OH Et	0 - 0,14	0 - 0,17	0 - 0,10	Nam: 0 - 0,13 Nữ: 0 - 0,21
PD	0 - 0,55	0 - 0,17	0 - 0,49	Nam: 0 - 0,12 Nữ: 0 - 0,23
PT	0 - 0,25	Nam: 0 - 0,36 Nữ: 0 - 0,25	0 - 0,18	Nam: 0 - 0,16 Nữ: 0 - 0,24
A'3	0,05 - 18,9	0 - 5,42	0 - 0,30	0 - 0,15
THE	0,16 - 2,76	0,08 - 6,6	0,02 - 4,34	0,17 - 5,08
THF	0,01 - 0,87	0,02 - 0,9	0,03 - 1,14	0,02 - 1,11
5 α -THF	0,02 - 4,0	0,02 - 2,47	0,03 - 2,43	0,03 - 1,51
α -Cortolone	0 - 0,20	0 - 1,15	0,01 - 2,74	0,03 - 1,37
β -Cortol	0 - 0,12	0 - 0,19	0,01 - 0,33	0,02 - 0,27
β -Cortolone	0,02 - 0,68	0,01 - 1,17	0 - 0,82	0,06 - 0,64
α -Cortol	0 - 0,53	0 - 0,67	0 - 0,6	0,01 - 0,18
THS	0 - 0,10	0 - 0,10	0 - 0,04	0 - 0,03

Có sự khác biệt giữa nam và nữ ở trẻ 8-<11 tuổi ở 6 thông số và PT của trẻ 1 tháng- 2 tuổi (Kiểm định Mann Withney).

Bảng 3.8. Tỷ lệ chẩn đoán theo tuổi

Tỷ lệ	Giá trị trung vị, (Min-Max)				p*
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3	Nhóm 4	
1	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
2	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
3	1,67 0,34- 8,0	1,8 0,3- 10,8	1,52 0,4 - 4,1	1,01 0,20- 2,6	0,007
4	0,056 0,05-7,10	1,0 0,09-3,33	0,66 0,24-2,59	0,96 0,38-4,95	0,000
5	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
6	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
7	Không xác định	Không xác định	1,0 0,0 - 5,0	1,61 1,0 - 3,09	0,007
8	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: có sự khác biệt tỷ lệ giữa các nhóm tuổi

Bảng 3.9. Khoảng tham chiếu cho tỷ lệ chẩn đoán

Tỷ lệ	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3	Nhóm 4
1	Nam: < 0,19 Nữ: < 0,11	< 0,09	< 0,07	Nam: < 0,06 Nữ: < 0,15
2	< 0,11	< 0,09	< 0,10	< 0,10
3 ở nam	0,27-12,0	0,39-10,18	0,42-3,33	0,45-2,06
4 ở nam	0,13 -1,85	0,09 -2,65	0,24 -1,32	0,38 - 3,31
5	< 0,31	< 0,69	< 0,13	< 0,17
6	< 2,94	< 1,59	< 1,47	Nam: < 0,82 Nữ: < 0,78
7 ở nam	Không XD	Không XD	0,2-4,3	0,95-2,89
8 ở nam	Không XD	0,0-2,1	0,0-5,0	0,32-1,0

Tỷ lệ 1: PT/(THE+THF+5 α -THF) Tỷ lệ 6: (THF +5 α -THF)/THE

Tỷ lệ 2: THS/ (THE +THF +5 α -THF) Tỷ lệ 7: An/Et

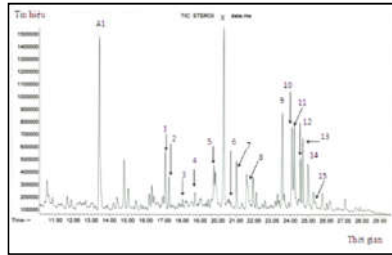
Tỷ lệ 3: 5 α -THF/THF

Tỷ lệ 8: Et/An

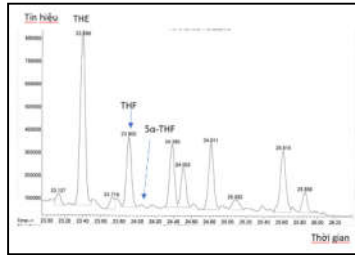
Tỷ lệ 4: THF/5 α -THF

Tỷ lệ 5: DHEA/(THE+THF+5 α -THF)

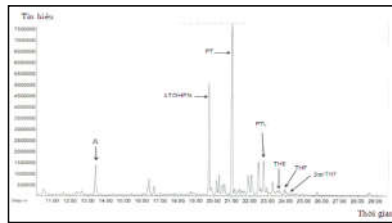
Tỷ lệ 3 và 4 cũng như 7 và 8 có ý nghĩa trong chẩn đoán thiếu enzym 5 α -reductase type 2 ở nam nên khoảng tham chiếu cho các tỷ lệ này xây dựng cho nam.



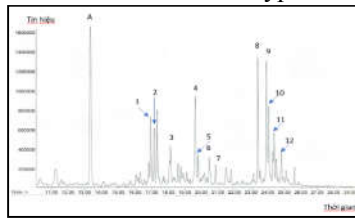
Biểu đồ 3.1. Sắc ký đồ mẫu chuẩn



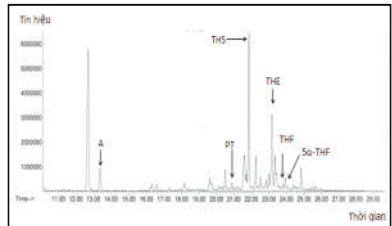
Biểu đồ 3.2. Sắc ký đồ mẫu thiếu 5 α -reductase type 2



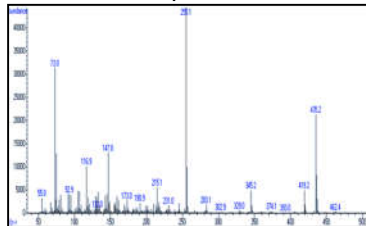
Biểu đồ 3.3. Sắc ký đồ mẫu thiếu 21-OH



Biểu đồ 3.4. Sắc ký đồ mẫu thiếu 3 β -HSD II



Biểu đồ 3.5. Sắc ký đồ mẫu thiếu 11 β -OH



Biểu đồ 3.6. Mảnh ion đặc hiệu của PT

Sắc ký đồ mẫu thiếu 21-OH đặc trưng bởi có sự xuất hiện đỉnh 17OHPN, PTL mà mẫu bình thường không có hoặc rất thấp, đỉnh PT cao.

Sắc ký đồ mẫu thiếu 11 β -OH đặc trưng bởi có sự xuất hiện đỉnh THS mà mẫu thường không có hoặc rất thấp. Mẫu thiếu 5 α -reductase

type 2 đặc trưng bởi đỉnh 5 α -THF thấp hơn rất nhiều so với THF. Mẫu thiếu 3 β -HSD type 2 đặc trưng bởi đỉnh DHEA (3) cao trong khi không xuất hiện đỉnh 17OHPN, PTL, THS.

Bảng 3.10. Kết quả steroid niệu ở BN thiếu 21-OH

Steroid	Trung vị, (min, max) Đơn vị $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine		Nhóm chứng (n = 269)
	Chưa điều trị (n=37)	Điều trị (n=69)	
An	0,49 (0,0-63,7)	0,18 (0,0-29,7)	0,04 (0 – 27,51)
Et	0,18 (0,0-36,6)	0,09 (0,0-17,2)	0,03 (0 – 15,14)
DHEA	0,19 (0,01-29,7)	0,17 (0,0-81,9)	0,13 (0 – 25,35)
11 Keto-An	0,44 (0,01-12,7)	0,26 (0,0-19,6)	0,11 (0 – 8,81)
11OH-An	2,13 (0,01-48,3)	0,88 (0,0-57,3)	0,13 (0 – 9,03)
11OH Et	0,12 (0,0-1,81)	0,05 (0,0-3,85)	0,06 (0 – 3,73)
PD	0,4 (0,04-7,7)	0,31 (0,0-12,1)	0,11 (0 – 7,74)
PT	10,4 (0,04-110)	4,72 (0,13-416)	0,11 (0 – 3,66)
A'3	0,3 (0,003-5,07)	0,11 (0,0-21,2)	0,18 (0 – 92,03)
THE	1,51 (0,09-53,5)	3,52 (0,04-88,4)	3,67 (0,05 – 104)
THF	0,47 (0,01-20,3)	0,74 (0,0-92,7)	0,99 (0,0 – 23,6)
5 α -THF	0,46 (0,02-20,7)	1,05 (0,02-64,5)	1,83 (0,0 – 21,3)
α -Cortolone	0,27 (0,03-6,22)	0,53 (0,02-4,09)	0,61 (0 – 25,15)
β -Cortol	0,09 (0,0-6,52)	0,22 (0,0-8,85)	0,2 (0 – 6,18)
β -Cortolone	0,28 (0,04-28,8)	0,68 (0,01-21,6)	0,72 (0,0 – 14,1)
α -Cortol	0,06 (0,00-2,92)	0,11 (0,01-3,41)	0,2 (0 – 5,14)
THS	0,02 (0,0-2,07)	0,02 (0,0-3,45)	0,03 (0 – 0,7)

Nồng độ An, Et, PT ở BN chưa điều trị cao hơn đã điều trị trong khi THE, THF, 5 α -THF thấp hơn đã điều trị. Nồng độ An, Et, PT ở BN thiếu 21-OH cao hơn so với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Bảng 3.11. Kết quả steroid niệu ở BN thiếu 5 α -reductase type 2

Mã NC	Tuổi	5 α -THF/THF		THF/5 α -THF		Tỷ lệ An/Et		Tỷ lệ Et/An	
		NB	Tham chiếu	NB	Tham chiếu	NB	Tham chiếu	NB	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		KXĐ		1,0	
VD18	3,5	0,02		42,6		KXĐ		0,5	
VD12	4	0,05		18,7		KXĐ		KXĐ	
VD19	5	0,13		7,9		KXĐ		1,0	
VD14	5,1	0,02		41,0		0,05		2,8	
VD15	5,5	0,03		30		1,14		2,5	
VD13	8,5	0,04	0,20-2,6	27,3	0,38-3,31	0,33	0,95-2,89	34,0	0,32-1,0
VD16	10,5	0,03		32,3		0,21		5,04	
VN107	12,3	0,05		19,2		0,50		5,83	
VD20	12	0,04		23,8		0,80		2,84	

KXĐ: Không xác định

NB: người bệnh

14 bệnh nhân thiếu 5 α -reductase type 2 có tỷ lệ 5 α -THF/THF thấp, tỷ lệ THF/5 α -THF cao hơn khoảng tham chiếu.

Tỷ lệ Et/An cao ở trẻ >8 tuổi và trong giới hạn bình thường ở trẻ 2,6-5,5 tuổi.

Bảng 3.12. Kết quả steroid niệu ở BN thiếu 3 β -HSD II

STT	Steroid niệu	Nồng độ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine		Kết luận
		Người bệnh	Tham chiếu 8-<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	A3	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 DHEA, An, Et, 11-OH An và 11OH Et của người bệnh cao hơn khoảng tham chiếu của trẻ nam từ 8-11 tuổi.

Tỷ lệ DHEA/ (THE +THF +5 α -THF) = 2,55 cao hơn 17 lần giới hạn trên của khoảng tham chiếu (< 0,17).

Các tỷ lệ PT/(THE +THF +5 α -THF)=0,034 và THS/(THE +THF +5 α -THF)=0,002 trong giới hạn bình thường.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Kết quả thẩm định phương pháp

Kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng phương pháp sắc ký khí –khối phổ lần đầu được triển khai tại khoa Hóa sinh – Bệnh viện Nhi Trung ương. Thẩm định phương pháp là cần thiết và bắt buộc. Kết quả thẩm định với giới hạn định lượng từ 0,05 đến 0,16 $\mu\text{mol/L}$ với phần lớn các steroid quan trọng đảm bảo độ nhạy của phương pháp trong chẩn đoán ngay cả với mẫu nước tiểu loãng. Độ thu hồi đạt 90-115(%) tương tự nghiên cứu khác trên thể giới của Homma K, Caufield M. Độ lặp và tái lập với mẫu trộn bình thường lần lượt có CV 1,01-7,72 và 10,16-14,53 (%). Độ lặp và tái lập với mẫu trộn bệnh lý lần lượt có CV là 0,78-9,72 và 12,51-16,95 (%). Độ lặp có CV <10% và tái lập có CV <20% đảm bảo sự ổn định của kỹ thuật trong một lần xét nghiệm và các lần làm xét nghiệm khác nhau. Kết quả ngoại kiểm của phòng xét nghiệm tương quan chặt chẽ với hệ số tương quan $r > 0,97$ và tương đồng với giá trị trung vị từ 28 phòng xét nghiệm khác nhau trên thể giới tham gia chương trình ngoại kiểm của SKML.

Kết quả thẩm định phương pháp cho thấy kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS tại khoa Hóa sinh – Bệnh viện Nhi Trung ương đáp ứng được yêu cầu về độ tin cậy để thực hiện xét nghiệm cho người bệnh.

4.2 Khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ em

Khoảng tham chiếu steroid niệu được xây dựng cho 17 nồng độ steroid niệu và 8 tỷ lệ chẩn đoán quan trọng giúp chẩn đoán phần lớn các bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid thường gặp như thiếu 21-OH, thiếu 11 β -OH, thiếu 3 β -HSD II, thiếu 5 α -reductase type 2 và một số bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormone steroid khác. Khoảng tham chiếu xây dựng cho trẻ khỏe mạnh từ sơ sinh (1 ngày tuổi) đến 11 tuổi ở cả nam và nữ với số lượng tương đương chia làm 4 nhóm tuổi.

Sự phân bố của các steroid niệu và các tỷ lệ chẩn đoán không theo quy luật chuẩn (Gaussian) nên khoảng tham chiếu được lấy là 95% giá trị nằm trong khoảng từ phân vị thứ 2,5 đến 97,5 sau khi sắp xếp các giá trị theo thứ tự tăng dần theo hướng dẫn của IFCC.

Có sự khác biệt nồng độ các steroid niệu giữa các nhóm tuổi nhóm 1 (từ 1-28 ngày tuổi), nhóm 2 (1 tháng-<2 tuổi), nhóm 3 (2-< 8 tuổi) và nhóm 4 (8- \leq 11 tuổi) nên khoảng tham chiếu được xây dựng cho từng khoảng tuổi. Nồng độ cortol và cortolone tăng dần theo tuổi, nồng độ An,

Et, 11OH An và 11OH Et thấp ở trẻ < 8 tuổi và tăng rõ rệt ở trẻ 8- \leq 11 tuổi. DHEA, 11 Keto An, A³ ở trẻ sơ sinh cao và giảm ở trẻ 1 tháng -2 tuổi đó tăng ở nhóm 4. Nồng độ THS thấp ở mọi lứa tuổi. Khoảng tham chiếu của 17 steroid niệu ở trẻ <8 tuổi không có sự khác biệt giữa nam và nữ ngoại trừ PT của trẻ 1 tháng-2 tuổi và được thiết lập chung cho cả nam và nữ. Riêng trẻ 8-11 tuổi, nồng độ 6 steroid niệu gồm An, Et, 11keto-An, 11OH Et, PD, PT ở nữ cao hơn nam với $p < 0,05$. Nguyên nhân do nữ dậy thì sớm hơn nam (nữ dậy thì từ 8-12 tuổi, nam dậy thì sau khoảng 1-2 năm, từ 11-14 tuổi). Khoảng tham chiếu steroid niệu được xây dựng theo đơn vị $\mu\text{mol/mmol}$ creatinine giúp hạn chế sự giao động nồng độ steroid niệu ở mẫu nước tiểu ngẫu nhiên tại các thời điểm khác nhau.

Tỷ lệ chẩn đoán được coi là công cụ hữu hiệu giúp chẩn đoán xác định và chẩn đoán phân biệt các thể bệnh TSTTBS khác nhau. Dựa vào sơ đồ sinh tổng hợp và chuyên hóa của các enzym tham gia tổng hợp steroid mà nhiều tác giả đưa ra các tỷ lệ chẩn đoán khác nhau cho từng bệnh lý thiếu hụt enzym tham gia sinh tổng hợp steroid. Tỷ lệ PT/(THE + THF +5 α -THF) được chúng tôi sử dụng trong chẩn đoán thiếu 21-OH có sự khác biệt giữa các nhóm tuổi và khác nhau giữa nam và nữ ở trẻ sơ sinh và trẻ 8- \leq 11 tuổi tương tự như Krone và cộng sự, Kamrath C và cộng sự.

Tỷ lệ THS/(THE + THF +5 α -THF) được chúng tôi sử dụng trong chẩn đoán thiếu 11 β -OH, tỷ lệ này thấp ở mọi lứa tuổi và không khác biệt giữa nam và nữ tương tự Krone N, Kamrath C.

Tỷ lệ DHEA/(THE +THF +5 α -THF) được chúng tôi sử dụng trong chẩn đoán thiếu 3 β -HSD II, tỷ lệ này khác biệt rõ rệt giữa các lứa tuổi nhưng không khác biệt giữa nam và nữ.

Tỷ lệ An/Et và 5 α -THF/THF được chúng tôi sử dụng trong chẩn đoán thiếu 5 α -reductase type 2 ở trẻ nam (NST 46,XY) mắc rối loạn phát triển giới tính. Trong đó tỷ lệ 5 α -THF/THF được sử dụng trong chẩn đoán ở trẻ \geq 6 tháng, tỷ lệ An/Et sử dụng ở trẻ > 2 tuổi.

Tỷ lệ (THF + 5 α -THF)/THE được sử dụng trong chẩn đoán AME, tỷ lệ này có khác biệt giữa nam và nữ ở trẻ 8-<11 tuổi.

4.3. Đặc điểm steroid niệu ở bệnh nhân TSTTBS, RLPTGT

Ứng dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC-MS trong chẩn đoán TSTTBS và RLPTGT cho 200 bệnh nhân đã phát hiện 106 bệnh nhân thiếu 21-OH, phát hiện 5 bệnh nhân thiếu 11 β -OH, phát hiện 14 bệnh nhân thiếu 5 α -reductase type 2 và 1 bệnh nhân thiếu 3 β -HSD II.

Đặc điểm xét nghiệm steroid niệu ở bệnh nhân thiếu 21-OH chưa điều trị đặc trưng bởi đỉnh sự xuất hiện của đỉnh 17OHPN, PTL mà mẫu bình thường không rõ. Nồng độ PT cao hơn khoảng tham chiếu ở 100% bệnh nhân và tỷ lệ PT/(THE +THF +5 α -THF) cao ở 86,5% bệnh nhân thiếu 21-OH. 100% bệnh nhân thiếu 21-OH có tỷ lệ THS/(THE +THF +5 α -THF) bình thường. 27,0% bệnh nhân có tỷ lệ DHEA/(THE + THF + 5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu do tăng tổng hợp androgen ở bệnh nhân TSTTBS do thiếu 21-OH. Đã có 13/37 bệnh nhân chẩn đoán thiếu 21-OH bằng định lượng steroid niệu được phân tích gen CYP21A2 để khẳng định và đều phát hiện có đột biến gây bệnh.

Đặc điểm steroid niệu ở bệnh nhân thiếu 11 β -OH chưa điều trị: xuất hiện đỉnh THS rõ trên sắc ký đồ mà mẫu bình thường không rõ. Nồng độ THS và tỷ lệ THS/(THE +THF +5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu ở cả 3 bệnh nhân. Tỷ lệ PT/(THE +THF +5 α -THF) cao hơn khoảng tham chiếu ở 1 bệnh nhân. Các bệnh nhân được phân tích gen CYP11B1 để khẳng định và phát hiện có đột biến gây bệnh.

Đặc điểm steroid niệu ở bệnh nhân thiếu 3 β -HSD II là nồng độ DHEA và tỷ lệ DHEA/(THE +THF +5 α -THF) cao hơn tham chiếu trong khi không có dấu hiệu thiếu 21-OH và 11 β -OH khi định lượng steroid niệu khi không có mặt các đỉnh bất thường 17OHPN, PTL, THS. Tỷ lệ PT/(THE +THF +5 α -THF) và THS/(THE +THF +5 α -THF) trong giới hạn bình thường. Đây là bệnh nhân nghi mắc thiếu 3 β -HSDII thể không cổ điển, rối loạn điện giải và khác biệt với hai ca lâm sàng mắc thiếu 3 β -HSD II thể cổ điển được mô tả trước đây của Vũ Chí Dũng.

Đặc điểm steroid niệu ở bệnh nhân thiếu 5 α -reductase type 2 đặc trưng bởi hình ảnh sắc ký đồ có đỉnh THF rõ trong khi 5 α -THF rất thấp so với THF, hầu như không thấy trên sắc ký đồ. Tỷ lệ 5 α -THF/THF thấp và tỷ lệ THF/5 α -THF cao hơn tham chiếu được thấy ở 100% bệnh nhân (từ 6 tháng - 12,3 tuổi), trong khi đó tỷ lệ An/Et thấp hơn tham chiếu chỉ thấy ở trẻ > 5 tuổi. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân thiếu 5 α -reductase type 2 là trẻ nam (NST 46,XY) có dấu hiệu dương vật nhỏ, lỗ đái thấp, bìu chẻ đôi và giống với bộ phận sinh dục nữ khi sinh. 8 bệnh nhân đã được phân tích gen SRD5A2 có đột biến gây bệnh để khẳng định chẩn đoán.

Có 1 bệnh nhân kết hợp thiếu 21-OH và 11 β -OH khi phân tích gen nhưng chỉ có dấu hiệu thiếu 21-OH mà không có dấu hiệu thiếu 11 β -OH.

Còn 74 bệnh nhân chưa xác định được trong đó có một số mắc TSTTBS đã điều trị hydrocortisone ngay khi vào viện trước khi lấy mẫu

nước tiểu. Một số bệnh nhân không mắc TSTTBS do thiếu 21-OH có kết quả âm tính với đột biến gen CYP21A2. Một số bệnh nhân mắc dậy thì sớm, rối loạn điện giải do nhiều nguyên nhân khác nhau, một số bệnh nhân RLPTGT do bất thường nhiễm sắc thể giới tính, bất thường quá trình biệt hóa, vì vậy cần tiếp tục tìm các nguyên nhân khác.

KẾT LUẬN

1. Thẩm định phương pháp và xây dựng khoảng tham chiếu:
 - 1.1. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng steroid niệu bằng kỹ thuật GC/MS đạt các tiêu chuẩn về độ chính xác và xác thực do vậy có thể áp dụng trong chẩn đoán và theo dõi điều trị bệnh rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid bẩm sinh.
 - 1.2. Giá trị tham chiếu steroid niệu được thiết lập cho 17 sản phẩm chuyển hóa steroid niệu, 8 tỷ lệ chẩn đoán cho trẻ khỏe mạnh từ sơ sinh đến ≤ 11 tuổi theo 4 nhóm tuổi, cho từng giới tính khi có sự khác biệt giữa nam và nữ đáp ứng quy định của IFCC/CLSI và phục vụ trong chẩn đoán các bệnh lý rối loạn sinh tổng hợp hormon steroid bẩm sinh ở trẻ em.
2. Ứng dụng kỹ thuật định lượng steroid niệu bằng GC/MS giúp chẩn đoán cho 106 người bệnh thiếu 21-OH trong đó 37 người chưa điều trị, 5 người bệnh thiếu 11 β -OH trong đó 3 người chưa điều trị, 1 người bệnh thiếu 3 β -HSD II và 14 người bệnh thiếu 5 α -reductase type 2. Nhiều người bệnh đã được khẳng định bằng phân tích gen gây đột biến tương ứng. Còn 74 người bệnh chưa phát hiện rối loạn sinh tổng hợp steroid niệu dựa vào kỹ thuật định lượng steroid niệu.

KHUYẾN NGHỊ

Khuyến cáo bác sỹ lâm sàng làm xét nghiệm định lượng steroid niệu bằng GC-MS trong các trường hợp nghi ngờ mắc TSTTBS, RLPTGT.

Triển khai thêm định lượng một số steroid niệu quan trọng PTL, THA, THB, THS... giúp ích thêm trong chẩn đoán rối loạn tổng hợp steroid bẩm sinh và mắc phải.

Xây dựng thêm khoảng tham chiếu steroid niệu cho trẻ > 11 tuổi, nhằm hỗ trợ chẩn đoán, theo dõi điều trị ở trẻ > 11 tuổi.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC
ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. 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*, số 1: 150-154.
2. Trần Thị Ngọc Anh, Trần Thị Chi Mai, Trần Minh Điền, Vũ Chí Dũng (2017). Ba bệnh nhân 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*, số 1: 53-57.
3. Trần Thị Ngọc Anh, Trần Thị Chi Mai, Trần Minh Điền (2017). Thận định quy trình định lượng steroid niệu bằng kỹ thuật sắc ký khí khối phổ. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 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 Thị 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-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*, phụ bản tập 23, 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, tập 3: 445-451.

MINISTRY OF EDUCATION & TRAINING MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



TRAN THI NGOC ANH

**URINE STEROID PROFILING BY GC/MS FOR DIAGNOSIS
OF CONGENITAL STEROID BIOSYNTHESIS DISORDERS IN
CHILDREN**

Specialized : Biochemistry

Code : 62720112

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

HANOI – 2019

**THE DISSERTATION IS COMPLETED IN HANOI
MEDICAL UNIVERSITY**

**Advisors : 1. PhD. Tran Thi Chi Mai
2. Ass Prof. PhD. Tran Minh Dien**

Reviewer 1: Ass Prof. PhD. Nguyen Thi Ha

Reviewer 2: Ass Prof. PhD. Nguyen Nghiem Luat

Reviewer 3: Ass Prof. PhD. Nguyen Phu Dat

The dissertation will be protected at the Board of University
doctoral dissertation evaluation at the Hanoi Medical University:

The contents of the dissertation can be found at:

- National Library of Vietnam
- Library of Hanoi Medical University

INTRODUCTION

1. Necessity of the research.

Steroid disorders in children: congenital adrenal hyperplasia is a genetic disorder with a high incidence which is early detected and treated in newborn screening. The disease is caused by acquired mutations in a group of genes that are responsible for the biosynthesis from three various steroid hormones including glucocorticoids, mineralocorticoids, and sex hormones. Deficiency of 21-OH, 11 β -OH, 3 β -HSD II and 5 α -reductase type 2 are the commonest causes of such disorder and 17 α -OH/17, 20-lyase, aromatase deficiency, 11 β -HSD II, 17 β -HSD are some rare causes. Early diagnosis and timely treatment for babies after birth are important to reduce mortality and complications. Quantitative steroids permits diagnosis of other forms of enzyme deficiencies causing steroid biosynthetic disorders that have been applied for over 35 years in the world but have not been processed in Vietnam. The number of patients with congenital adrenal hyperplasia and sex development disorder in Vietnam is high, especially at the National Children's Hospital; it's currently managing nearly 1,000 patients, so the quantitative analysis of steroids by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) might aid diagnosis and monitoring congenital steroid biosynthetic disorders in children. Before applying new methods to patients, it needs to be assessed, setup a reference interval of steroid hormones in children and apply this for diagnosis CAH and DSD.

2. Purpose.

***Purpose 1:** Urinary steroid profiling with GC/MS requires an appropriate validation and set out reference intervals for the urinary steroid metabolomics for children under 11 years old.*

***Purpose 2:** Urinary steroid profiling with GC/MS to diagnose some forms of biosynthesis of steroid hormones in the congenital adrenal cortical hyperplasia.*

3. Location

The study is Department of Biochemistry - Vietnam National Children's Hospital.

4. New contribution of the study

GC/MS analysis of urinary steroid hormones is now the go to method in the first time in Vietnam and the evaluation criteria meet the technical requirements of accuracy and authenticity. Reference intervals for 17 urinary steroids and 8 diagnostic ratios are established for children younger than 11 years of age. Based on this method, diagnosis of 21-OH, 11 β -OH, 3 β -HSD II and 5 α -reductase type 2 deficiencies in many patients are confirmed by corresponding mutation analysis.

5. Scientific and practical significance of the study.

The research is highly practical and contributes to providing a modern diagnostic method to detect steroid biosynthetic disorders. This method permits diagnosis of other forms of enzyme deficiencies causing congenital adrenal hyperplasia, thereby reducing the number of cases that require genetic analysis to reduce the cost of diagnosis and treatment.

This research has scientific significance with tightly-packed layout, appropriate data processing methods, international standards for new technical implementation with the method of evaluation, reference an interval which is applied to the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia and sex development disorder.

Theme of study is innovative, trendy and up-to-date which successfully implements quantitative urinary steroids method in the first time in Vietnam, and it has been routinely applied to patients since 2018.

4. The structure of thesis.

- The thesis is presented in 136 pages (excluding references and appendices). It is divided into 7 parts: 2 pages of Introduction; Chapter 1: 40 pages of Overview; chapter 2: 16 pages of Subjects and research methods; Chapter 3: 46 pages of Results; chapter 4: 29 pages of Discussion; 2 pages of Conclusion; 1 page of Recommendation.

- The thesis consists of 34 tables, 34 charts, figures and diagrams, 129 references, including 20 documents in Vietnamese and 109 documents in English. The appendix includes: Sample survey and evaluation forms; collective form, results of genetic analysis; list of patients participating in the study.

Chapter 1: OVERVIEW

1. Pathology of steroid biosynthetic disorders

Deficiency of any enzyme responsible for the biosynthesis also disrupts steroid biosynthesis, which is divided into three main groups,

including congenital adrenal hyperplasia (CAH), disorders of electrolyte, and disorders of sex development (DSD). The most common cause is deficiency of 21-hydroxylase enzyme accounted for more than 90% of cases of CAH, deficiency of 11 β -OH ranked second with 5-8%, deficiency of 3 β -HSD II and other enzymes are rare causes of CAH. In addition, deficiency of enzyme 5 α -reductase type 2 causes a reduction in the synthesis of 5 α -dihydrotestosterone, resulting the feminisation of men-children, which is one of the two most common causes of DSD in men-children with 46,XY chromosomes.

Quantification of 17-OH-P from a dried blood spot helps to detect cases of typical CAH due to deficiency of 21-OH, and some patients with deficiency of 11 β -OH, however, it cannot help to detect cases of CAH and DSD due to deficiency of 3 β -HSD II, Cyt P450 oxidoreductase (POR), 5 α -reductase type 2, AME (apparent mineralocorticoid excess). At the same time, 17-OHP test shows a high false-positive in preterms, low birth weight newborn and it is irrespective of CAH types also.

2. GC/MS analysis of urinary steroid quantification

Urinary steroid quantification by Selective Ion Monitoring Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS-SIM) has been applied over the world since the 1980s to date in diagnosing forms of congenital adrenal hyperplasia. The method has high sensitivity and specificity and urine specimens, so it is suitable for all subjects, especially children. Each pathology of enzyme deficiency has a characteristic chromatographic pattern due to a deficiency of hormones and an increase of precursor in previous position of enzyme. The concentration of steroids compared with the reference intervals and the diagnostic precursor-to-product ratios are used to detect and distinguish different disorders of biosynthesis of steroid hormones due to deficiency of 21-OH, 11 β -OH, 3 β -HSD II or 5 α -reductase type 2 and deficiency of 17-OH, POR, AME...

Urinary steroid quantification was first implemented in Vietnam, so it is necessary to evaluate the method and set out the reference intervals according to international guidelines to ensure the quality of method and comply with ISO 15189.

Technical process is improved under the guidance of Honour JW, Ronda F Greaves. In patients with clinical signs of CAH and DSD, we quantify the concentration of steroid hormones met the diagnostic criteria of steroid biosynthetic disorders and then collect the results of electrolytes and ACTH in the medical record and a genetic analysis is

suggested to confirm the diagnosis.

Chapter 2 SUBJECTS AND METHODS OF RESEARCH

2.1. Subjects of Research

2.1.1. Control group:

Including 269 healthy children aged from 1 day to 11 years, divided into 4 groups:

Group 1: 64 children from 1 day to 28 days old.

Group 2: 61 children from 1 month (≥ 29 days) to < 2 years old.

Group 3: 74 children from 2 years old to < 8 years old.

Group 4: 70 children aged 8- < 11 years.

Sex: Masculine and feminine ratio is equal.

Selection criteria: Healthy children do not have abnormal signs of CAH and sex development disorder. Full-term infant according to WHO standards within each gestational term of 37-42 weeks, birth weight $> 2500g$, with no family history of a disorder. Specimens were collected at the Department of Obstetrics and Gynecology of Vinh Phuc General Hospital, the commune or ward health clinics where carried out the routine vaccination program for children, kindergartens and primary schools in Vinh Phuc province and Hanoi City and from groups of disease in the meanwhile.

Exclusion criteria: The family and/or the children do not agree to participate in the study, the child has one of the clinical signs suspecting the above mentioned CAH or DSD or receiving corticosteroids within 1 month.

2.1.2. Group of diseases:

Including 200 patients suspected of having a steroid biosynthetic disorders, diagnosed with CAH, DSD, and ED by endocrinologists and pediatricians.

Location: Department of Endocrinology - Metabolism - Genetics of Vietnam National Children's Hospital and Department of Pediatric Surgery - Viet Duc Hospital.

Sampling time: from October 2015 to July 2018.

Selection criteria: when there are one or more signs:

Patients with CAH: Clinical and laboratory standards based on announced New MI standards.

Clinical symptoms: Ambiguous genitalia, genitals may not appear clearly male or female children; signs of early puberty in boys; signs of dehydration, adrenal insufficiency in both men and women.

Patients with disorders of sex development:

There are symptoms: Genital abnormalities such as micropenis, narrowing of the urethra, hidden testicles, penile agenesis, double scrotum and female external organs. Bodies of male children to appear feminized such as breast development, menstruation, signs of primary amenorrhea in female appearance.

Families and/or patients suspected of having CAH and DSD consented and signed an informed consent form to participate into the research group.

Exclusion criteria: patients and/or families do not agree to participate in the study.

Patients with electrolyte disorders merely due to systemic diseases, digestive organs without clinical signs CAH, DSD.

Patients with dysplasia steroid biosynthetic disorders such as drug-related Cushing syndrome, Addison, adrenal adenoma.

Specimens: Random urine specimens were stored for 2 weeks at $2-8^{\circ}C$, 6 months at $-20^{\circ}C$

2.3.3. Method of Research

- Validation of GC-MS urinary steroid method based on Westgard's instructions with the following contents: Determine the limits of detection, recovery, imprecision and accuracy.

- Establish the urinary steroid reference intervals in children according to the guidelines of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Evaluate the distribution of each urinary steroid, calculate the reference intervals for men and women in each age group which be set for both men and women in case of without difference. Calculate the diagnostic ratio, set

out the concentration intervals and diagnostic ratios for men and women in each age group. If there is no difference the concentration intervals will be common for both men and women. Reference interval calculated by non-parametric method with non-standard distribution data. Arrange the data in the increasing direction of the value, select the low value and the high value of the reference interval from the list of referenced values so that the low reference value corresponds to the 2.5 percentile (2.5% percentile) and high reference value corresponding to percentile 97.5 (97.5% percentile) of the reference interval.

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

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

In which:

$x_{0,025}$ is the low reference value corresponding to 2.5 percentile.

$x_{0,975}$ is the high reference value corresponding to the 97.5 percentile.

n is the number of samples that set out for reference interval

- Develop standards for diagnosis and application of urinary steroid quantification in the diagnosis and monitoring of steroid biosynthetic disorders in patients suspected of having CAH or DSD.

- Collect results of blood tests, genetic analysis in medical records.

Diagnostic criteria were established for a number of conditions of steroid enzyme deficiency based on Krone et al., Chan OK et al. in the laboratory's existing condition.

Diagnosis of **21-OH deficiency** when there are the following characteristics:

- ✓ There is the appearance of peak 17OHPN, PTL on chromatogram (qualitative).
- ✓ The PT concentration is higher than the reference intervals.
- ✓ The ratio of PT/ (THE +THF +5 α -THF) is higher than the reference intervals.
- ✓ The ratio of THS/ (THE+THF+5 α -THF) in the reference intervals.

Diagnosis of **11 β -OH deficiency** when there are the following characteristics:

- ✓ There is a clear appearance of THS peak on chromatogram (qualitative).

- ✓ The concentration of THS is higher than the reference intervals.
- ✓ The ratio THS/ (THE +THF +5 α -THF) is higher than the reference.

Diagnosis of **3 β -HSD II deficiency** when there are the following characteristics:

- ✓ DHEA levels are higher than the reference intervals.
- ✓ The ratio of DHEA/ (THE +THF +5 α -THF) is higher than the reference intervals.
- ✓ There are no signs of deficiency of 21-OH or 11 β -OH when urinary steroid quantification is conducted.

Diagnosis of **5 α -reductase type 2** deficiency when there are the following criteria:

- ✓ The ratio of 5 α -THF/THF is lower than the reference intervals or the ratio of THF/5 α -THF is higher than the reference intervals.
- ✓ As a male patient with chromosome 46,XY, there are clinical signs of micropenis, narrowing of the urethra, double scrotum.

Ratio of THF/5 α -THF is higher than the reference intervals and chromosome 46,XY in male children with DSD signs are two standards became mandatory.

2.3.7. Analyzing and processing data.

Use Excell, SPSS 22.0 software, Method validation software in data processing and method comparison.

Chapter 3: RESEARCH RESULTS

3.1. Results of method validation

Table 3.1: Limit of quantitative and recovery

Number	Steroids	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)	Recovery (%)
1	An	0.11	13.18	102,5
2	Et	0.05	10.69	114,7
3	DHEA	0.10	17.84	113,3
4	11 keto An	0.12	8.36	111,1
5	11-OH An	0.07	19.3	112,0
6	11-OH Et	0.09	10.48	113,6
7	PD	0.07	14.64	100,0
8	PT	0.07	16.86	101,5
9	A'3	0.21	9.82	91,4
10	THE	0.16	11.28	112,7
11	THF	0.11	18.43	110,2
12	5 α -THF	0.11	18.07	106,3
13	α -Cortolone	0.09	8.32	91,3
14	β -Cortol	0.11	15.16	91,8
15	β -Cortolone	0.06	10,9	99,4
16	α -Cortol	0.27	13,09	90,9

Quantitative limits of 14/16 steroids ranged from 0.05 to 0.16 $\mu\text{mol/L}$, particularly α -Cortol and A'3 had quantitative limits of 0.27 and 0.21 ($\mu\text{mol/L}$) respectively which is higher than other products but less valuable in diagnosing congenital adrenal hyperplasia.

Recovery of steroid metabolic products is from 90% to 115%. The average is $101.9 \pm 8.4\%$ ($\bar{X} \pm \text{SD}$).

Table 3.2. Short term imprecision

Steroids	Pool normal			Pool anormal		
	\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

Short-term accuracy of urinary steroid metabolic products with normal specimens has CV from 1.01 to 7.72%.

Short-term accuracy of urinary steroid metabolic products with pathological specimens has a CV of 0.78 to 9.72%.

The median value of CV in normal specimens is 4.0 ± 2.2 (%) and pathological specimens is 4.7 ± 2.7 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$).

Table 3.3. Long term imprecision

Steroids	Pool normal			Pool anormal		
	\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

The median value \pm SD of CV in normal specimens is 12.85 ± 1.24 (%) and pathological specimens is 14.86 ± 1.4 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$).

Table 3.4: Correlation between results and median of EQA

Steroids	Slope a	Intercept b	Phuong trinh	r correlation
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

The urinary steroids are closely correlated with the median values of the EQA results with a correlation coefficient r of 0.97-0.999. The

angle coefficient approximates the value 1.0 and intersects the vertical axis at point b with a value of approximately 0, so the linear lines almost go through the origin. THE and DHEA are higher than EQA value with a coefficient of 1.25 and 11-OH Et is lower than external quality assessment value with a coefficient of 0.611. The urinary steroids have agreement similarity to the median value of external quality assessment.

3.2. Reference intervals of steroids in children

Table 3.5: Age and sex in controls

Age \ Sex	Boys		Girls		p
	n	%	n	%	
Group 1th: 1-28 days	34	53.1	30	46.9	0.617
Group 2th: 1 m - <2 years	31	50.8	30	49.2	0.898
Group 3th: 2 - < 8 years	43	58.1	31	41.9	0.163
Group 4th: 8-11 years	29	41.4	41	58.9	0.151
Sum	137	50.9	132	49.1	0.243

There is no difference in the number of boys and girls in each age group as well as with the total number of men and women ($p > 0.05$).

Distribution of urinary steroid metabolic products

All 16 parameters of steroid levels do not follow the Gaussian distribution. Comparison is based on median value (med.), lowest value (min), highest value (max). The reference intervals comprising 95% of the median value is taken at the cutoff points of 2.5th and 97.5th percentiles.

The concentration of An, Et, 11OH An and 11OH Et is very low in children < 8 years of age, increasing gradually in children aged 8-11 years. Concentration of THE, THF, 5 α -THF increases with age.

Table 3.6. Concentration of steroids

Steroids	Median (min-max) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine				p
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	
	n=64	n=61	n=74	n=70	
An	0.02 1-0.56	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- 0.19	0.09 0.01-0.60	0.000
DHEA	0.14 0.01- 3.03	0.05 0- 1.29	0.02 0-0.01	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 - 1.32	0.06 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 -4.0	0.08 0.01-0.43	0.000
THS	0.01 0-0.20	0.01 0-0.71	0.01 0-0.10	0.01 0-0.04	0.000

There were differences between ages with $p \leq 0.001$ (Mann Withney U test.)

Table 3.7: Reference intervals (RI) of steroids

Steroids	RI $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine			
	Group 1th	Group 2th	Group 3th	Group 4th
An	0 – 0.1	0 – 0.1	0 – 0.17	Boys: 0 – 0.38 Girls: 0 – 0.86
Et	0 – 0.09	0 – 0.1	0 – 0.12	Boys: 0 – 0.29 Girls: 0 – 0.46
DHEA	0.01 – 0.68	0 – 0.86	0 – 0.26	0.01 – 0.22
11 Keto-An	0.01 – 0.58	0 – 0.26	0 – 0.29	Boys: 0- 0.39 Girls: 0- 0.45
11OH-An	0 – 0.20	0 – 0.70	0 – 0.28	0.01 – 0.52
11OH Et	0 – 0.14	0 – 0.17	0 – 0.10	Boys: 0 – 0.13 Girls: 0 – 0.21
PD	0 – 0.55	0 – 0.17	0 – 0.49	Boys: 0 – 0.12 Girls: 0 – 0.23
PT	0 – 0.25	Boys: 0- 0.36 Girls: 0- 0.25	0 – 0.18	Boys: 0- 0.16 Girls: 0 – 0.24
A'3	0.05 – 18.9	0 – 5.42	0 – 0.30	0 – 0.15
THE	0.16 – 2.76	0.08 – 6.6	0.02 – 4.34	0.17 – 5.08
THF	0.01 – 0.87	0.02 – 0.9	0.03 – 1.14	0.02 – 1.11
5 α -THF	0.02 – 4.0	0.02 – 2.47	0.03 – 2.43	0.03 – 1.51
α -Cortolone	0 – 0.20	0 – 1.15	0.01 – 2.74	0.03 – 1.37
β -Cortol	0 – 0.12	0 – 0.19	0.01 – 0.33	0.02 – 0.27
β -Cortolone	0.02 – 0.68	0.01 – 1.17	0 – 0.82	0.06 – 0.64
α -Cortol	0 – 0.53	0 – 0.67	0 - 0.6	0.01 – 0.18
THS	0 – 0.10	0 – 0.10	0 – 0.04	0 – 0.03

There were differences between men and women in children aged 8-11 years in 6 parameters and PT of children from 1-month to 2-year-old $p < 0.05$ (Mann Withney U test).

Table 3.8: Ratios for diagnostic

Ratios	Median, (Min-Max)				p
	Group 1th	Group 2th	Group 3th	Group 4th	
1	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
2	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
3	1.67 0.34- 8.0	1.8 0.3- 10.8	1.52 0.4 – 4.1	1.01 0.20- 2.6	0.007
4	0.056 0.05-7.10	1.0 0.09-3.33	0.66 0.24-2.59	0.96 0.38-4.95	0.000
5	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
6	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
7	NA	NA	1.0 0.0 – 5.0	1.61 1.0 – 3.09	0.007
8	NA	0.79 0.0-4.0	0.72 0.0-5.0	0.59 0.25-1.16	0.001

There were differences between ages with $p \leq 0.01$ (Kruskal-Wallis U test)

Table 3.9: Reference intervals for ratios

Ratios	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
1	Boys: < 0.19 Girls: < 0.11	< 0.09	< 0.07	Boys: < 0.06 Girls: < 0.15
2	< 0.11	< 0.09	< 0.10	< 0.10
3 in boys	0.27-12.0	0.39-10.18	0.42-3.33	0.45-2.06
4 in boys	0.13 – 1.85	0.09 – 2.65	0.24 – 1.32	0.38 – 3.31
5	< 0.31	< 0.69	< 0.13	< 0.17
6	< 2.94	< 1.59	< 1.47	Boys: < 0.82 Girls: < 0.78
7 in boys	NA	NA	0.2-4.3	0.95-2.89
8 in boys	NA	0.0-2.1	0.0-5.0	0.32-1.0

Ratio 1: PT/(THE+THF+5 α -THF)

Ratio 2: THS/ (THE +THF +5 α -THF)

Ratio 3: 5 α -THF/THF

Ratio 6: (THF +5 α -THF)/THE

Ratio 7: An/Et

Ratio 8: Et/An

Ratio 4: THF/5 α -THF Ratio 5: DHEA/(THE+THF+5 α -THF)

The ratios (3) and (4) as well as (7) and (8) are significant in diagnosing deficiency of 5 α -reductase type 2 in men, so the reference intervals for these ratio is established for men.

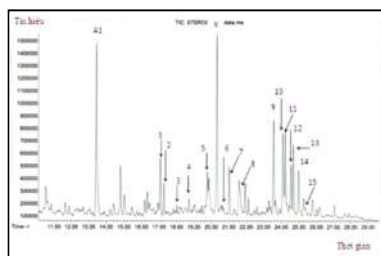


Figure 3.1: Chromatography of standard

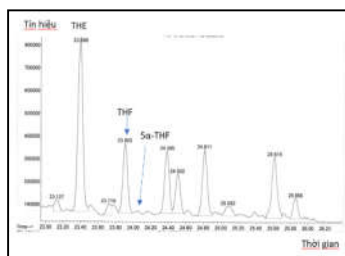


Figure 3.2: Chromatography of 5 α -reductase type 2 def

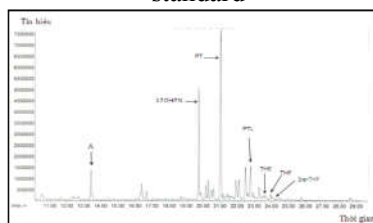


Figure 3.3: Chromatography of 21-OH def

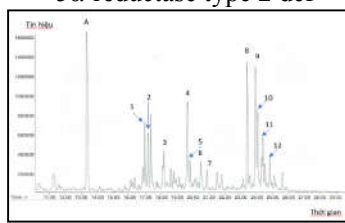


Figure 3.4: Chromatography of 3 β -HSD II def

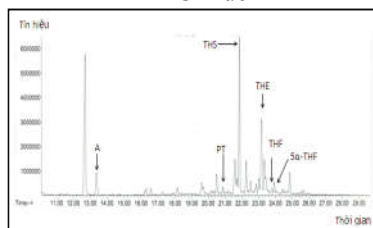


Figure 3.5: Chromatography of 11 β -OH def

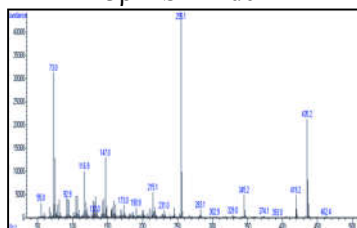


Figure 3.6: Ion fragment of PT

Chromatography total of sample with 21-OH deficiency: present peak 17OHPN, PTL. Sample with 11 β -OH: present peak THS. Sample with 5 α -reductase type 2: peak 5 α -THF was very lower than THF. Sample with 3 β -HSD type 2: peak DHEA (3) was higher than normal sample.

Table 3.10: Level of steroids in patients with 21-OH def

Steroids	Median, (min, max) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine		Controls (n = 269)
	Before treat (n=69)	After treat (n=37)	
An	0.49 (0.0-63.7)	0.18 (0.0-29.7)	0.04 (0 – 27.51)
Et	0.18 (0.0-36.6)	0.09 (0.0-17.2)	0.03 (0 – 15.14)
DHEA	0.19 (0.01-29.7)	0.17 (0.0-81.9)	0.13 (0 – 25.35)
11 Keto-An	0.44 (0.01-12.7)	0.26 (0.0-19.6)	0.11 (0 – 8.81)
11OH-An	2.13 (0.01-48.3)	0.88 (0.0-57.3)	0.13 (0 – 9.03)
11OH Et	0.12 (0.0-1.81)	0.05 (0.0-3.85)	0.06 (0 – 3.73)
PD	0.4 (0.04-7.7)	0.31 (0.0-12.1)	0.11 (0 – 7.74)
PT	10.4 (0.04-110)	4.72 (0.13-416)	0.11 (0 – 3.66)
A'3	0.3 (0.003-5.07)	0.11 (0.0-21.2)	0.18 (0 – 92.03)
THE	1.51 (0.09-53.5)	3.52 (0.04-88.4)	3.67 (0.05 – 104)
THF	0.47 (0.01-20.3)	0.74 (0.0-92.7)	0.99 (0.0 – 23.6)
5 α -THF	0.46 (0.02-20.7)	1.05 (0.02-64.5)	1.83 (0.0 – 21.3)
α -Cortolone	0.27 (0.03-6.22)	0.53 (0.02-4.09)	0.61 (0 – 25.15)
β -Cortol	0.09 (0,0-6.52)	0.22 (0.0-8.85)	0.2 (0 – 6.18)
β -Cortolone	0.28 (0.04-28.8)	0.68 (0.01-21.6)	0.72 (0.0 – 14.1)
α -Cortol	0.06 (0.00-2.92)	0.11 (0.01-3.41)	0.2 (0 – 5.14)
THS	0.02 (0.0-2.07)	0.02 (0.0-3.45)	0.03 (0 – 0.7)

The concentration of An, Et, and PT in patients who received treatment is higher than those of untreated patients. The concentration of An, Et,

PT in patients with 21-OH deficiency was higher than the control group with statistical significance with $p < 0.01$.

Table 3.11: Steroids in patients with 5 α -reductase type 2 deficiency

Code	Ages (year)	5 α -THF/THF		THF/5 α -THF		Tỷ lệ An/Et		Tỷ lệ Et/An	
		Result	RI	Result	RI	Result	RI	Result	RI
VD17	0.5	0.11	0.30-10.8	9.0	0.09-2.65	ND	ND	ND	0.0-2.1
VD21	1.5	0.04		24.0		ND	ND	ND	
VD11	1.9	0.08		13.0		ND	ND	ND	
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		ND		1.0	
VD18	3.5	0.02		42.6		ND		0.5	
VD12	4	0.05		18.7		ND		ND	
VD19	5	0.13		7.9		ND		1.0	
VD14	5.1	0.02		41.0		0.05		2.8	
VD15	5.5	0.03		30		1.14		2.5	
VD13	8.5	0.04	0.20-2.6	27.3	0.38-3.31	0.33	0.95-2.89	34.0	0.32-1.0
VD16	10.5	0.03		32.3		0.21		5.04	
VN107	12.3	0.05		19.2		0.50		5.83	
VD20	12	0.04		23.8		0.80		2.84	

ND: Not detected

14 patients with 5 α -reductase type 2 deficiency had a lower ratio of 5 α -THF/THF than the reference intervals, the ratio of An/ Et was lower than the reference intervals in 5 patients aged 5.1-12.3. 14/14 patients had a THF/ α -THF ratio higher than the reference intervals, the Et/An ratio was high in children > 8 years old.

Table 3.12: Level of steroids in patient with 3 β -HSD II def

No	Steroids	Level μ mol/mmol creatinine		Conclusion
		Results	RI of 8-11 years old	
1	An	0.73	0.01– 0.38	High
2	Et	0.65	0 – 0.29	High
3	DHEA	8.6	0.01 – 0.22	Very high
4	11 Keto-An	0.26	0.01 – 0.39	Normal
5	11OH-An	0.78	0.01 – 0.52	High
6	11OH Et	0.17	0 – 0.13	High
7	PD	0.08	0 – 0.12	Normal
8	PT	0.12	0-0.16	Normal
9	A3	0.06	0 – 0.15	Normal
10	THE	1.69	0.17 – 5.08	Normal
11	THF	1.03	0.02 – 1.11	Normal
12	5 α -THF	0.65	0.03 – 1.51	Normal
13	α -Cortolone	0.54	0.03 – 1.37	Normal
14	β -Cortol	0.02	0.02 – 0.27	Normal
15	β -Cortolone	0.20	0.06 – 0.64	Normal
16	α -Cortol	0.20	0.01– 0.18	Normal
17	THS	0.01	0 – 0.03	Normal

The concentration of DHEA, An, Et, 11-OH An and 11OH Et of the patients was higher than the control group.

The ratio of DHEA/ (THE +THF +5 α -THF) = 2.55 is 17 times higher than the upper limit of the reference interval (<0.17).

The ratios of PT/(THE +THF +5 α -THF)=0,034 and THS/(THE +THF +5 α -THF)=0.002 are in the reference interval.

CHAPTER 4: DISCUSSION

4.1. Results of validation method

Urinary steroid quantification by gas chromatography-mass spectrometry was first implemented in the Department of Biochemistry - Vietnam National Children's Hospital. Method validation is necessary and mandatory. Validation results with a quantitative limit of 0.05 to 0.27 $\mu\text{mol/L}$ ensure the sensitivity in diagnosis even with diluted urine specimens of infants. Recovery has reached 90-115 (%) similar to other researches by Homma K, Caufield M. Short-term and long-term accuracy with normal urine specimens has CV 1.01-7.72 and 10.16-14.53 (%) respectively. Short-term and long-term accuracy with pathological urine specimens have CV of 0.78-9.72 and 12.51-16.95 (%) respectively. Ensure the stability of the method in one test and the various tests. Test results of the laboratory are closely correlated with the correlation coefficient $r > 0.97$ and similar to median values from 28 different laboratories in the world participating in the External Quality Assessment Scheme SKML.

The results of the validation have showed that the GC-MS urinary steroid method at the Department of Biochemistry - Vietnam National Children's Hospital met the requirements of accuracy and authenticity to patients.

4.2 Reference intervals for the urinary steroid in children

The reference intervals for the urinary steroid is established for 17 steroid urinary concentrations and 8 important diagnostic ratios to help diagnose most of the common disorders of steroid hormones due to deficiency of 21-OH, 11 β -OH, 3 β -HSD II or 5 α -reductase type 2 and electrolyte disorders due to hyperaldosteronism AME, High cortisol. The reference intervals for 269 healthy children from birth (1 day of age) to 11 years in both men and women with the same number divided into 4 age groups.

The distribution of urinary steroids and diagnostic ratio is not Gaussian, so the reference interval is 95% of the range from the 2.5 to

97.5 percentile after disposition. The values are in ascending order according to IFCC guidelines.

There are differences in the concentration of steroids between age groups of group 1 (from 1-28 days of age), group 2 (1 month - <2 years), group 3 (2- <8 years) and group 4 (8- \leq 11 years old, so the reference intervals is set out for each age group. The concentration of cortol and cortolone increases with age, the concentration of An, Et, 11OH An and 11OH Et is lower in children <8 years of age and markedly increased in children aged 8-11 years. DHEA, 11 Keto An, A³ in newborns were high and decreased in group 2 and then increased in group 4. Concentration of THS is low at all ages. The reference intervals of 17 steroids in group 1, group 2 and group 3 has without difference between men and women except for group 2 and was increased for both men and women. Particularly for group 4, concentration of 6 urinary steroids includes An, Et, 11keto-An, 11OH Et, PD, PT in female is higher than male with $p < 0.05$. Female puberty comes earlier than male (female puberty is between 8-12 years, while male puberty is about 1-2 years, from 11-14 years). The reference intervals for the urinary steroid is established in $\mu\text{mol/mmol}$ creatinine while different authors build other reference intervals for different ages in different units such as $\mu\text{mol/L}$, $\mu\text{g/mg}$ creatinine, $\mu\text{g/mmol}$ creatinine or $\mu\text{mol}/24\text{h}$.

The diagnosis ratio is considered as an effective tool to help to detect and diagnose different types of CAH. Based on the diagram of the biosynthesis and metabolism of enzymes involved in steroid synthesis, many authors offer different diagnostic ratios for each pathology of enzyme deficiency involved in steroid biosynthesis. The ratio of $\text{PT}/(\text{THE} + \text{THF} + 5\alpha\text{-THF})$ was used in diagnosis of 21-OH deficiency has differences between age groups and between men and women in newborns and children 8 - \leq 11 years which is similar to Krone et al., Kamrath C et al.

The ratio of $\text{THS}/(\text{THE} + \text{THF} + 5\alpha\text{-THF})$ was used in the diagnosis of

11-OH deficiency, it is low at all ages and did not differ between men and women similar to Krone N, Kamrath C.

We use the ratio of DHEA/(THE +THF +5 α -THF) in diagnosis of 3 β -HSD II deficiency, it is markedly different between ages but between men and women, it has no sign.

An/Et and 5 α -THF/THF ratios are used in the diagnosis of 5 α -reductase type 2 deficiency in men-children (chromosome 46,XY) with sex development disorder. In which the ratio of 5 α -THF/THF is used in diagnosis in children \geq 6 months.

The ratio (THF + 5 α -THF)/THE is used in AME diagnosis, it varies between men and women at 8-11 years old.

4.3. Characteristics of urinary steroids in patients with CAH, DSD

Application of GC-MS urinary steroid quantification in diagnosis of CAH and DSD for 200 patients shows that 106 patients found with 21-OH deficiency, 5 patients with 11 β -OH deficiency, 14 patients with 5 α -reductase type 2 deficiencies and 1 patient with 3 β -HSD II deficiency.

Characteristics of urinary steroid method in patients with 21-OH deficiency are marked by the peak of 17OHPN and PTL which is not clear in normal specimens. The concentration of PT is higher than the reference intervals in 98.1% of patients with 21-OH deficiency, high PT/(THE +THF +5 α -THF) ratio in 89.6% of 21-OH-deficient patients, however in patients who have been treated with hydrocortisol may have normal value. 100% of patients with 21-OH deficiency have normal THS/(THE +THF +5 α -THF) ratio. 27 patients is confirmed with a 21-OH deficiency diagnosis by genetic mutation analysis for CYP21A2.

Characteristics of steroids in patients with 11 β -OH deficiency: THS peaks appear on chromatograms where the sample is normally unknown. THS concentrations and THS/(THE +THF +5 α -THF) ratio were higher than the reference intervals in 5/5 patients. The concentration of PT and the ratio of PT/(THE +THF +5 α -THF) was higher than the reference

intervals in 2/5 patients with a moderate level in patients with 21-OH deficiency. Five-fifths of the patients with CYP11B1 had a mutation and another patient had an unknown mutation when measuring steroids. Plus 1 patient with 21-OH and 11 β -OH deficiency in genetic analysis but only signs of 21-OH deficiency and without signs of 11 β -OH deficiency.

Urinary steroid characteristics in patients with 5 α -reductase type 2 is characterized by a chromatogram with a clear peak of THF while 5 α -THF is very low compared to THF and it's hardly seen in chromatograms. The ratio of 5 α -THF/THF is lower and the THF/5 α -THF ratio is higher than that of the reference in 100% of patients (from 6 months - 12.3 years), while the An/Et ratio is lower than the reference only seen in children > 5 years old.

Characteristics of steroids in patients with a deficiency of 3 β -HSD II are higher concentrations of DHEA and higher DHEA / (THE + THF + 5 α -THF) levels while there are no signs of 21-OH and 11 β -OH deficiency.

There were 74 unidentified patients, some of whom had CAH treated hydrocortisone as soon as they were hospitalized before collecting urine specimens. Some patients do not suffer from CAH due to 21-OH deficiency with negative results for CYP21A2 gene mutation. Some patients with early puberty, electrolyte disorders due to many different causes, some patients with DSD due to sex chromosomal abnormalities, abnormal process of differentiation, so it is necessary to continue to look for the causes.

CONCLUSION

2. Validation and Establishment of reference intervals:

2.1. Results of validation of quantitative analysis of steroids is conducted at Department of Biochemistry - Vietnam National Children's Hospital meets the standards of repeatability, reproducibility,

recovery, accuracy so it can be applied in diagnosis and monitoring treatment of congenital adrenal hyperplasia.

- 1.2. The reference intervals for the urinary steroid is established for 17 steroid urinary concentrations and 8 important diagnostic ratios for 269 healthy children from birth to ≤ 11 years divided by 4 age groups, for each gender when there is a difference between men and women meet IFCC/CLSI regulations and serve in diagnosing congenital adrenal hyperplasia in children.

2. Application of GC-MS urinary steroid quantification method

Application of GC-MS urinary steroid quantification method helps to diagnose of 21-OH deficiency in 106 patients (37 patients before treat hydrocortisone), 11 β -OH deficiency in 5 patients (3 patients before treat hydrocortisone), 3 β -HSD II deficiency in 1 patient and 5 α -reductase type 2 deficiency in 14 patients, of which many patients were confirmed by genetic mutations analysis respectively. 74 patients have not yet detected typical urinary steroid disorders.

RECOMMENDATIONS

Recommendation of clinicians to apply GC/MS urinary steroid quantification method in cases of electrolyte disorders and suspicion of CAH, DSD.

Deploying more important quantitative urinary steroids PTL, THA, THB, THS in diagnosing disorders of congenital and dysplasia steroid biosynthetic disorders.

Establish more steroids reference intervals for children > 11 years old, to support the diagnosis and follow-up treatment in these age group.

LIST OF PAPERS RELATED TO DISSERTATION

10. Tran Thi Ngoc Anh, Nguyen Viet Hoa, Tran Thi Chi Mai, Tran Minh Dien, Vu Chi Dung (2017). Two cases of sex development disorders were diagnosed and treated at Vietduc hospital. *Vietnam Medical Journal*, Vol 1: 150-154.
11. Tran Thi Ngoc Anh, Tran Thi Chi Mai, Tran Minh Dien, Vu Chi Dung (2017). Three patients with congenital adrenal hyperplasia by 21-hydroxylase deficiency were diagnosed and treated at Vietduc hospital. *Vietnam Medical Journal*, Vol 1:53-57.
12. Tran Thi Ngoc Anh, Tran Thi Chi Mai, Tran Minh Dien (2017). Validation of urine steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry. *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, Vol 3: 73-78.
13. Tran Thi Ngoc Anh, Tran Thi Chi Mai, Tran Minh Dien, Vu Chi Dung (2017). Urine steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry in diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Vietnam Medical Journal*, Vol. 458: 75-84.
14. Mai Thi Chi Tran, Ngoc Anh Thi Tran, Phuong Mai Nguyen, Chi Dung Vu, Minh Dien Tran, Diem Ngoc Ngo, Huy Hoang Nguyen, Ronda F Greaves (2018). 11-Hydroxylase deficiency detected by urine steroid metabolome profiling using gas chromatography-mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry* 7: 1-5.
15. Tran Thi Ngoc Anh, Tran Thi Chi Mai, Tran Minh Dien, Vu Chi Dung, Ronda F Greaves (2018). Urine steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and application. *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, Vol 22, No 3: 37-43.
16. Tran Thi Ngoc Anh, Tran Thi Chi Mai, Tran Minh Dien, Vu Chi Dung, Ronda F Greaves (2018). Urine steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry in diagnosis of congenital adrenal hyperplasia and disorder of sex development. *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, Vol 22, No 3: 196-204.
17. Tran Thi Ngoc Anh, Tran Thi Chi Mai, Nguyen Viet Hoa, Tran Minh Dien, Vu Chi Dung, Ronda F Greaves (2019). Establishing the reference intervals of urine steroid metabolome by GC-MS for children. *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, Supplement of Vol 23, No 1: 151-159.
18. Tran Thi Ngoc Anh, Tran Thi Chi Mai, Nguyen Viet Hoa, Tran Minh Dien, Vu Chi Dung, Ronda F Greaves (2019). Application of GC-MS urine steroid metabolome in diagnosis of sexual development due to deficiency of enzyme 5 α -reductase type 2. *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, Supplement of Vol 23, No 3: 445-451.