

Đánh giá độ chính xác của bộ xét nghiệm xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng ứng dụng chẩn đoán vô sinh ở nam giới

Nguyễn Minh Thu, Nguyễn Thị Trang*

Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 8/5/2019; ngày chuyển phản biện 16/5/2019; ngày nhận phản biện 26/6/2019; ngày chấp nhận đăng 2/7/2019

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá độ chính xác của bộ xét nghiệm cải tiến xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng ở các trường hợp nam giới vô sinh. **Đối tượng nghiên cứu và phương pháp:** nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 50 mẫu tinh dịch của bệnh nhân nam giới được chẩn đoán vô sinh đến làm xét nghiệm tại Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội và có mật độ tinh trùng ≥ 1 triệu/ml. Kết quả nghiên cứu cho thấy, bộ xét nghiệm cải tiến có hệ số biến thiên $CV\% = 2,26\% < 5\%$; $t_m = 0,97 < t_c$. Như vậy có thể kết luận: bộ xét nghiệm xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng cải tiến đạt yêu cầu của một bộ xét nghiệm định lượng.

Từ khóa: DFI, đứt gãy ADN tinh trùng, vô sinh.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Vô sinh hiện nay là vấn đề sức khỏe sinh sản với tỷ lệ gia tăng ở mức đáng báo động, được toàn xã hội quan tâm. Trong đó, vô sinh nam có tỷ lệ khá cao (gần tương đương như vô sinh nữ) nhưng vẫn chưa được coi trọng đúng mức do vấn đề cơ sở vật chất kỹ thuật, định kiến xã hội [1, 2]. Tại Việt Nam, hiện chỉ có xét nghiệm tinh dịch đồ được chỉ định thường quy và phổ biến, các chỉ số có mức độ quan trọng tương đương như định lượng kẽm, fructose trong tinh dịch [2], chỉ số đứt gãy ADN tinh trùng, mức độ stress oxy hóa... thì lại chưa được quan tâm đúng mức. Xét nghiệm đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng được xây dựng trên phương pháp đánh giá sự phân tán chất nhuộm sắc (Sperm Chromatin Dispersion - SCD) do Fernandez và cs công bố năm 2003 [3], không chỉ cho biết được độ hoàn thiện của ADN tinh trùng mà còn đánh giá được khả năng sinh sản của nam giới, góp phần chẩn đoán và theo dõi điều trị vô sinh [4]. Mặc dù đã khẳng định được vai trò của mình trong chẩn đoán vô sinh nam [4], nhưng hiện nay xét nghiệm đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng mới chỉ xuất hiện tại một số trung tâm hỗ trợ sinh sản và bệnh viện lớn; lại được tiến hành bằng bộ kit nhập ngoại Halosperm của Hãng Halotech ADN (Tây Ban Nha) với giá thành khá cao, nên số lượng bệnh nhân đồng ý làm xét nghiệm vẫn còn hạn chế. Xuất phát từ tình hình thực tế trên, nhóm nghiên cứu

đã tiến hành xây dựng và đánh giá độ chính xác của bộ xét nghiệm cải tiến xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng ở nam giới vô sinh theo phương pháp SCD với mục tiêu hoàn thiện quy trình, hạ giá thành nhưng vẫn đảm bảo chất lượng xét nghiệm để đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng ở nam giới Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

50 mẫu tinh dịch của bệnh nhân nam được chẩn đoán vô sinh tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, làm xét nghiệm đánh giá độ đứt gãy ADN tinh trùng tại Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

Tiêu chuẩn lựa chọn: bệnh nhân nam từ 18 tuổi, xét nghiệm tinh dịch đồ kết quả mật độ tinh trùng ≥ 1 triệu/ml và đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: bệnh nhân nam giới không thỏa mãn các tiêu chuẩn trên, bị các bệnh: ung thư bộ phận sinh dục, HIV, giang mai, lậu, bệnh cấp tính, bệnh tâm thần và bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Cỡ mẫu: để hoàn thiện quy trình, xác định độ chính xác, chúng tôi sử dụng công thức tính cỡ mẫu cho một nghiên cứu

*Tác giả liên hệ: Email: trangnguyen@hmu.edu.vn

Evaluation on the accuracy of a test kit for analysing sperm DNA fragmentation in infertile men

Minh Thu Nguyen, Thi Trang Nguyen*

Hanoi Medical University

Received 8 May 2019; accepted 2 July 2019

Abstract:

The objective of this study is to evaluate the accuracy of the improved test kit for analysing sperm DNA fragmentation in infertile men. Subjects and methods: a cross-section study was conducted on 50 semen samples from infertile men with the sperm concentration ≥ 1 millions/ml. Results exhibited the improved test kit had the variable index $CV\% = 2.26\% < 5\%$; $t_m = 0.97 < t_c$. It can be concluded that the improved test kit for sperm DNA fragmentation analysis is qualified for quantitative tests.

Keywords: DFI, infertile, sperm DNA fragmentation.

Classification number: 3.2

cứ mô tả tính theo công thức của Lwanga và Lemeshow [5]:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{1-p}{\varepsilon^2 p}$$
 Trong đó: $1 - \alpha/2 = 0,95$; $\varepsilon = 0,10$;
 $p = 95\%$ (độ chính xác của quy trình tham chiếu), $n =$ số lần thực nghiệm cần thực hiện, tính được bằng 21, chúng tôi lấy gấp đôi và làm tròn số là 50.

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Phương pháp làm tiêu bản: cải tiến dựa trên quy trình SCD của Fernandez và cs (2003) [3], sử dụng bộ kit Halosperm của Hãng Halotech như sau:

Bước 1. Chuẩn bị thạch: đun cách thủy eppendorf chứa agarose pha sẵn ở nhiệt độ 95-100°C 5 phút hoặc trong lò vi sóng 3 phút, cho đến khi hóa lỏng hoàn toàn agarose. Pha loãng mẫu tinh dịch bằng dung dịch PBS sao cho nồng độ khoảng <15 triệu tinh trùng/ml tinh dịch. Giữ ống agarose ở nhiệt độ 37°C trong vòng 5 phút đến khi nhiệt độ trong eppendorf chứa thạch và nhiệt độ trong bể ủ nhiệt được cân bằng.

Bước 2. Chuẩn bị hỗn hợp tinh dịch - thạch: cho 25 μ l tinh dịch vào ống agarose và trộn đều bằng pipet. Giữ ống ở nhiệt độ 37°C và nhanh chóng thực hiện bước kế tiếp, tránh agarose bị đông. Nhỏ một giọt 25 μ l hỗn hợp tinh dịch - thạch lên vị trí được khoanh tròn trên lam kính, đặt lamen, ấn nhẹ, tránh bọt khí xuất hiện. Lam kính được đặt nằm ngang trong suốt quá trình thao tác. Đặt tiêu bản vào tủ lạnh 4°C, trong 10 phút để agarose đông lại.

Bước 3. Sau khi hỗn hợp tinh dịch - thạch đông lại, lấy tiêu bản ra khỏi tủ lạnh, bỏ lamen bằng cách trượt nhẹ ra.

Chuẩn bị dung dịch biến tính và làm biến tính ADN tinh trùng: lấy 80 μ l dung dịch biến tính cho vào ống đựng 10 ml nước cất, lắc đều sẽ được dung dịch biến tính cần thiết. Đặt tiêu bản vào khay chứa dung dịch biến tính trong vòng 7 phút.

Bước 4. Ly giải tế bào: lấy tiêu bản từ dung dịch biến tính và đặt vào khay chứa 10 ml dung dịch ly giải trong 5 phút.

Bước 5. Rửa dung dịch ly giải: sau khi kết thúc bước ly giải, đặt tiêu bản vào khay chứa nước cất trong 5 phút để rửa dung dịch ly giải.

Bước 6. Khử nước: khử nước bằng cách cho tiêu bản vào dung dịch cồn trong vòng 6 phút, sau đó để khô tự nhiên.

Bước 7. Nhuộm tiêu bản: đặt tiêu bản nằm ngang, nhỏ dung dịch Giemsa 5 - 30% phủ lên trên bề mặt tiêu bản, để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút rồi rửa qua nước từ vòi, chú ý tránh rửa quá mạnh làm nhạt màu quầng halo.

Xử lý số liệu

Đánh giá kết quả:

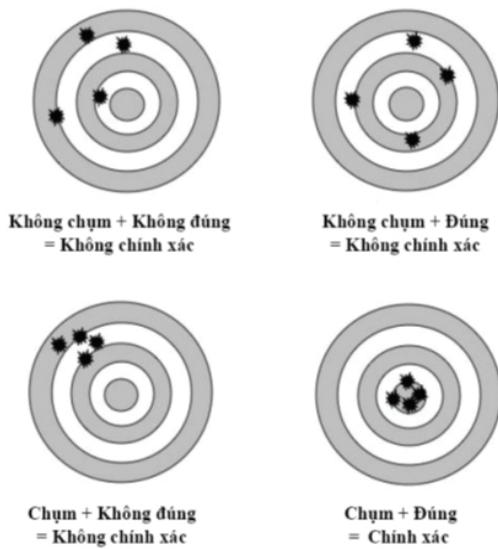
Quan sát lam kính dưới kính hiển vi quang học, đếm ít nhất 500 tinh trùng trên tiêu bản để xác định mức độ đứt gãy ADN của tinh trùng. Độ đứt gãy ADN tinh trùng được xác định bằng quầng Halo của tinh trùng theo Fernandez và cs [3].

Tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng (DFI - DNA Fragmentation Index) được xác định theo công thức:

$$DFI = \frac{TT \text{ có halo} + TT \text{ không có halo} + TT \text{ thoái hóa}}{\text{Tổng số TT đếm được}} \times 100\%$$

Phân tích số liệu:

Đánh giá chính xác của bộ xét nghiệm thông qua 2 chỉ số là độ chụm và độ đúng [6]:



Hình 1. Minh họa độ chính xác [6].

• Độ chụm là mức độ dao động của các kết quả thử nghiệm độc lập quanh giá trị trung bình. Độ chụm là một khái niệm định tính và được biểu thị định lượng bằng độ lệch chuẩn hay hệ số biến thiên. Độ chụm càng thấp thì độ lệch chuẩn hay hệ số biến thiên càng lớn.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD\% = CV\% = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

trong đó: SD: độ lệch chuẩn; n: số lần thí nghiệm; x_i : giá trị tính được của lần thí nghiệm thứ “i”; \bar{x} : giá trị trung bình của các lần thí nghiệm; RSD%: độ lệch chuẩn tương đối; CV%: hệ số biến thiên.

Độ chụm có thể được phân ra thành 3 trường hợp sau:

- Độ lặp lại (repeatability): thể hiện mức độ chính xác hay mức độ lặp lại, mức độ dao động giữa các kết quả thực nghiệm được thực hiện trong: i) cùng một phòng thí nghiệm; ii) cùng một mẫu thử đồng nhất; iii) cùng một kiểm nghiệm viên; iv) cùng một khoảng thời gian.

Độ lặp lại được xác định bằng cách: trên 1 mẫu tinh dịch của bệnh nhân, sử dụng bộ kit cải tiến tiến hành xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng lặp lại 10 lần. Tính độ lệch chuẩn SD và hệ số biến thiên CV% với yêu cầu $CV \leq 5\%$.

- Độ chụm trung gian (intermediate precision): biểu thị độ chính xác của phương pháp theo các biến số của phòng thí nghiệm: i) trong nhiều ngày; ii) với kiểm nghiệm viên khác nhau; iii) với các dụng cụ khác nhau.

- Độ tái lập (reproducibility): biểu thị độ chính xác của

nhiều phòng thí nghiệm tiến hành nghiên cứu trên cùng một mẫu đồng nhất. Tương tự như độ lặp lại với điều kiện: i) phòng thí nghiệm thay đổi; ii) thay đổi phương pháp.

• Độ đúng: chỉ mức độ gần nhau giữa giá trị trung bình của kết quả thử nghiệm và giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng μ .

Xác định độ đúng bằng cách: trên 1 mẫu tinh dịch của bệnh nhân đã được xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng bằng kit Halosperm, tiến hành xét nghiệm bằng bộ kit cải tiến lặp lại 10 lần, tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, từ đó tính được chuẩn t_m theo công thức sau, rồi so sánh với t_c , với yêu cầu $t_m < t_c$:

$$t_{tn} = \frac{|\mu - \bar{x}|}{\sqrt{\frac{S^2}{n}}}$$

trong đó: t_m : giá trị t thực nghiệm; μ : giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận (tham chiếu); \bar{x} : giá trị trung bình của phương pháp thử nghiệm; S^2 : phương sai phương pháp thử nghiệm; n: số lần thí nghiệm; $t_c(\alpha, k)$: giá trị t hằng số của Bảng phân phối chuẩn Student với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ và $k = n-1$.

Đạo đức nghiên cứu

Tất cả những thông tin về bệnh nhân được giữ bí mật và chỉ được phân tích để phục vụ tư vấn sinh sản cho bệnh nhân và cho nghiên cứu này, không sử dụng cho bất kỳ mục đích nào khác.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Trên 1 mẫu tinh dịch đã được xác định DFI bằng kit Halosperm, chúng tôi sử dụng bộ kit cải tiến tiến hành xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng lặp lại 10 lần. Kết quả thu được trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm xác định độ chính xác của bộ kit tự pha.

Lần thí nghiệm	DFI (%)
Lần 1	15,4
Lần 2	15,0
Lần 3	14,4
Lần 4	14,2
Lần 5	15,2
Lần 6	15,2
Lần 7	15,2
Lần 8	15,0
Lần 9	14,6
Lần 10	15,0
Chứng (làm bằng kit Halo)	14,8

Độ chụm

Do phạm vi phòng thí nghiệm nên chúng tôi sẽ tính độ chụm thông qua độ lặp lại. Từ bảng kết quả trên, chúng tôi thu được bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ chụm.

Giá trị trung bình DFI (%)	14,92
SD	0,391
CV%	2,62%

Trong các thử nghiệm, đặc biệt là thử nghiệm định lượng, có rất nhiều yếu tố sai số ảnh hưởng tới thử nghiệm, dẫn tới kết quả không chính xác. Do đó, để kiểm soát các yếu tố gây nhiễu này, cần thiết sử dụng khái niệm độ chụm. Độ chụm mô tả kết quả chỉ phụ thuộc vào yếu tố sai số ngẫu nhiên mà không liên quan đến kết quả thực của mẫu. Độ chụm càng thấp thì độ lệch chuẩn hay hệ số biến thiên càng lớn, và ngược lại, độ chụm càng lớn thì hệ số biến thiên càng nhỏ [6]. Trong nghiên cứu này, bộ kit cải tiến của chúng tôi có độ lặp lại với hệ số biến thiên CV% = 2,62%. Theo [6], hệ số biến thiên có giá trị không vượt quá 5% nói lên quy trình có độ lặp lại đạt yêu cầu của phép phân tích. Như vậy, khi có tác động của các yếu tố sai số ngẫu nhiên, với cùng một mẫu, mức độ đứt gãy ADN tinh trùng xác định được trong các điều kiện khác nhau có sai số trong khoảng chấp nhận được.

Độ đúng

Độ đúng chỉ mức độ gần nhau giữa các giá trị trung bình của kết quả thử nghiệm và giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng.

Với thực nghiệm kiểm định độ đúng, chúng tôi tính được $t_m = 0,97$; bên cạnh đó thông qua tra bảng có $t_c = 2,262$ [6]. Như vậy $t_m < t_c$. Điều đó đồng nghĩa với việc chỉ số đứt gãy ADN tinh trùng xác định bằng bộ kit cải tiến có kết quả tương đương với phương pháp sử dụng bộ kit thương mại Halosperm. Quy trình đạt được độ đúng theo yêu cầu của một phép phân tích.

Khảo sát cấu trúc chromatin tinh trùng (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA) được coi là một phương pháp tiêu chuẩn vàng để phân tích mức độ đứt gãy ADN tinh trùng. Một so sánh giữa kỹ thuật SCD của bộ kit Halosperm và SCSA đã được thực hiện trên 45 mẫu tinh dịch từ các bệnh nhân khám tại Trung tâm Y tế Sinh sản thuộc Đại học Minnesota (Hoa Kỳ). Các mẫu tinh dịch được xử lý đồng thời cho SCD và SCSA. Mức độ tương đồng giữa hai kỹ thuật là rất cao (hệ số tương quan nội hàm R: 0,85) khi sử dụng hàm Bland - Altman từ phần mềm SPSS để so sánh. Như vậy, bộ kit tự pha của chúng tôi cho kết quả tương đồng với bộ kit Halosperm, điều này cho thấy độ chính xác của bộ kit rất cao.

Tóm lại, bất kỳ kỹ thuật phân tích mức độ đứt gãy ADN

tinh trùng nào trong phòng thí nghiệm lâm sàng và phòng thí nghiệm hỗ trợ sinh sản đều phải đơn giản, có thể tái tạo, và tốt nhất là không cần mới, phức tạp, hoặc dụng cụ đắt tiền [7]. Như vậy, các kỹ thuật đánh giá kết quả xét nghiệm mức độ đứt gãy ADN tinh trùng bằng kính hiển vi thông thường nên được áp dụng phổ biến. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, bộ kit xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng có kết quả tương đương với bộ kit Halosperm®, có quy trình kỹ thuật đơn giản, nhanh chóng, chính xác và có khả năng tái sản xuất cao để phân tích sự đứt gãy ADN của tinh trùng.

Bộ kit này giúp bảo quản tốt hơn chất nhiễm sắc; kích thước quang sáng có thể được ước tính một cách chính xác với kính hiển vi thông thường nhờ sử dụng thuốc nhuộm Giemsa, hoặc xác định chính xác tuyệt đối bằng phần mềm tự động. Không giống như SCSA, bộ kit xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng có thể được sử dụng mà không cần các yêu cầu của dụng cụ phức tạp hoặc đắt tiền.

Kết luận

Bộ xét nghiệm cải tiến có độ chính xác đạt yêu cầu của một bộ xét nghiệm định lượng (với CV% = 2,62% < 5% và $t_m = 0,97 < t_c$).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của đồng nghiệp trong Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Việt Tiến, Ngô Huy Toàn và Bạch Huy Anh (2009), *Nghiên cứu thực trạng vô sinh ở Việt Nam theo các vùng sinh thái*, Đề tài cấp nhà nước, Bệnh viện Phụ sản Trung ương và Trường Đại học Y Hà Nội.
- [2] Trần Thị Trung Chiến, Trần Văn Hanh và Lê Văn Vệ (2009), *Vô sinh nam giới - Bệnh học giới tính nam*, Nhà xuất bản Y học, tr.72-122.
- [3] J. Fernandez, L. Muriel, V. Goyanes, et al. (2003), "Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test", *Fertil. Steril.*, **84**(4), pp.833-842.
- [4] N. Sheikh, I. Amiri, M. Farimani, et al. (2008), "Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men", *International Journal of Reproductive BioMedicine*, **6**(1), pp.13-18.
- [5] S.K. Lwanga and S. Lemeshow (1991), *Sample size determination in health studies, a practical manual*, WHO, Geneva.
- [6] Bộ Khoa học và Công nghệ (2015), *Tiêu chuẩn Việt Nam - TCVN 10863:2015, ISO/TS 22971:2005 về độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo - hướng dẫn sử dụng TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994) trong thiết kế, thực hiện và phân tích thống kê các kết quả độ lặp lại và độ tái lập liên phòng thí nghiệm*.
- [7] De C. Jonge (2002), "The clinical value of sperm nuclear DNA assessment", *Hum. Fertil. (Camb.)*, **5**(2), pp.51-53.