KHẢO SÁT ĐỘT BIẾN GEN *FLT3*-ITD VÀ *FLT3*-D835Y TRÊN BỆNH NHÂN BẠCH CẦU CẤP DÒNG TỦY

Châu Thúy Hà[1], Cao Văn Động[1], Phạm Kim Thạnh[1], Đoàn Thị Tuyết Thu[1], Phan Thị Xinh[1,2]

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định tỉ lệ *FLT3*-ITD và *FLT3*-D835Y bằng Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis và so sánh với giải trình tự thế hệ mới (NGS).

Kết quả: Nghiên cứu 154 người bệnh bạch cầu cấp dòng tủy mới chẩn đoán tại Bệnh viện Truyền máu Huyết học từ 01/2026 đến 06/2026. Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis phát hiện *FLT3*-ITD ở 21/154 trường hợp (13,64%) và *FLT3*-D835Y ở 5/154 trường hợp (3,25%); NGS phát hiện tương ứng 12/154 (7,79%) và 5/154 (3,25%). Có 9 trường hợp *FLT3*-ITD chỉ được phát hiện bằng Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis, chiếm 42,9% số trường hợp dương tính bằng phương pháp này (p < 0,05). NGS còn phát hiện I867T, D835H và p.Ile836del ở 3 người bệnh khác.

Kết luận: Trong nghiên cứu này, Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis phát hiện *FLT3*-ITD tốt hơn NGS, trong khi NGS phát hiện thêm các biến thể ngoài D835Y. Phối hợp hai kỹ thuật giúp hạn chế bỏ sót đột biến có ý nghĩa tiên lượng và điều trị.

Từ khóa: *FLT3-ITD, FLT3-D835Y, AML, Fragment analysis, NGS*

SUMMARY

PREVALENCE AND DETECTION OF *FLT3*-ITD AND *FLT3*-D835Y MUTATIONS IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Objectives: To determine the prevalence of *FLT3*-ITD and *FLT3*-D835Y using multiplex PCR combined with fragment analysis and compare detection with next-generation sequencing (NGS).

Results: The study included 154 newly diagnosed AML patients at the Blood Transfusion and Hematology Hospital from January to June 2026. Multiplex PCR combined with fragment analysis detected *FLT3*-ITD in 21 patients (13.64%) and *FLT3*-D835Y in five (3.25%); NGS detected these mutations in 12 (7.79%) and five (3.25%), respectively. Nine *FLT3*-ITD-positive cases were detected only by multiplex PCR combined with fragment analysis, representing 42.9% of cases positive by this method (p < 0.05). NGS additionally identified I867T, D835H and p.Ile836del in three other patients.

Conclusions: In this study, multiplex PCR combined with fragment analysis detected more *FLT3*-ITD-positive cases than the NGS workflow used, while NGS identified additional variants beyond D835Y. Combining both methods helps avoid missing mutations relevant to prognosis and treatment.

Keywords: *FLT3-ITD, FLT3-D835Y, AML, Fragment analysis, NGS.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch cầu cấp dòng tủy (Acute Myeloid Leukemia – AML) là bệnh ác tính huyết học không đồng nhất về di truyền phân tử. Phân loại WHO 2022 nhấn mạnh các đặc điểm di truyền trong xác định thể bệnh (1), còn khuyến cáo European LeukemiaNet (ELN) 2022 sử dụng các bất thường này để phân nhóm nguy cơ và định hướng điều trị (2).

Đột biến *FLT3* xuất hiện ở khoảng 25–30% người bệnh AML (3). Gen *FLT3* mã hóa thụ thể tyrosine kinase tham gia điều hòa tăng sinh và biệt hóa tế bào tạo máu. Hai dạng đột biến chính là lặp đoạn nội tại (*FLT3*-ITD) và đột biến vùng tyrosine kinase (*FLT3*-TKD), trong đó có D835Y.

FLT3-ITD gây hoạt hóa liên tục thụ thể FLT3, dẫn đến tăng sinh tế bào ác tính, ức chế apoptosis và góp phần vào quá trình sinh bệnh AML. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng *FLT3*-ITD liên quan chặt chẽ với tiên lượng xấu, tăng nguy cơ tái phát và giảm thời gian sống còn toàn bộ. Ngược lại, đột biến *FLT3*-TKD có vai trò tiên lượng không đồng nhất, phụ thuộc vào các bất thường đi kèm (2, 3).

Hiện nay, kỹ thuật NGS có thể khảo sát đồng thời nhiều gen, nhưng khả năng phát hiện *FLT3*-ITD phụ thuộc thiết kế panel, chiều dài đoạn đọc và thuật toán phân tích. Các ITD có cấu trúc phức tạp hoặc tỉ lệ alen thấp có thể bị bỏ sót nếu quy trình chưa được tối ưu (4, 5). Trong khi đó, fragment analysis

[1]Bệnh viện Truyền máu Huyết học
[2]Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh
Tác giả chịu trách nhiệm chính: Châu Thúy Hà
Email: HaCT@bth.org.vn
Mã bài: HHTM-39
Ngày nhận bài: 22/8/2026
Ngày phản biện khoa học: 20/8/2026
Ngày duyệt bài: 10/10/2026

sử dụng điện di mao quản để nhận diện thay đổi kích thước sản phẩm PCR, hỗ trợ phát hiện *FLT3*-ITD (6). Chính vì vậy, nhiều hướng dẫn quốc tế khuyến nghị sử dụng kết hợp NGS và Fragment analysis nhằm tối ưu hóa khả năng phát hiện đột biến *FLT3* (2, 5).

Tại Việt Nam, việc áp dụng NGS ngày càng phổ biến, tuy nhiên dữ liệu phối hợp và so sánh giữa NGS và Fragment analysis còn hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả phát hiện đột biến *FLT3* trong thực hành lâm sàng.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu tiến cứu, mô tả hàng loạt ca.

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu tại Khoa Di truyền học phân tử, Bệnh viện Truyền máu Huyết học, từ tháng 01/2026 đến tháng 06/2026.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

154 người bệnh AML mới chẩn đoán tại Bệnh viện Truyền máu Huyết học.

Cỡ mẫu, chọn mẫu

Tiêu chuẩn chọn đối tượng:

Người bệnh được chẩn đoán xác định bạch cầu cấp dòng tủy (AML) theo tiêu chuẩn WHO 2022.

Người bệnh mới chẩn đoán, chưa điều trị đặc hiệu trước đó.

Có chỉ định xét nghiệm đồng thời *FLT3*-ITD, *FLT3*-D835Y bằng Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis và NGS panel 108 gen.

Phương pháp chọn mẫu: chọn mẫu thuận tiện.

Thu nhận tất cả người bệnh thỏa tiêu chuẩn trong thời gian nghiên cứu.

Cỡ mẫu: tính theo công thức ước lượng tỉ lệ, với p = 0,25 (3), α = 0,05 và sai số e = 0,1, suy ra n ≈ 72 bệnh nhân.

Biến số, nội dung nghiên cứu

- Tỷ lệ phát hiện: Đột biến *FLT3*-ITD và đột biến *FLT3*-D835Y.

- So sánh khả năng phát hiện đột biến, tỉ lệ alen và khả năng nhận diện đa dòng giữa Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis và NGS.

Kỹ thuật, công cụ và quy trình thu thập số liệu.

Khảo sát *FLT3* bằng Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis và NGS sử dụng AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel kit và HEMEaccuTest™ DNA kit. Tiêu chuẩn chất lượng NGS: độ sâu giải trình tự ≥ 500X và ≥ 99% vùng đích đạt độ phủ ≥ 20X. Chỉ mẫu đạt kiểm soát chất lượng được phân tích biến thể. Kết quả từng ca được ghi nhận trong Excel để xử lý số liệu.

2.3. Xử lý và phân tích số liệu

Nghiên cứu sử dụng phần mềm SPSS để xử lý và so sánh tỉ lệ bằng phép kiểm χ^2.

2.4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu không can thiệp, sử dụng máu ngoại vi/tủy xương được chỉ định xét nghiệm thường quy, không gây thêm nguy cơ. Thông tin cá nhân được bảo mật và chỉ sử dụng cho nghiên cứu.

Đề tài được Hội đồng đạo đức bệnh viện thông qua, hướng đến cải thiện chẩn đoán phân tử, phân nhóm nguy cơ và điều trị cá thể hóa.

III. KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm chung

Từ tháng 01/2026 đến tháng 06/2026, nghiên cứu thu nhận 154 người bệnh AML mới chẩn đoán. Tuổi trung bình 42, khoảng tuổi 10–82; tỉ lệ nam:nữ là 1:1.

3.2. Tỉ lệ đột biến *FLT3*

Bảng 1. Tỷ lệ đột biến FLT3

Đột biến	Số lượng	Tỷ lệ %
FLT3-ITD	21	13,64
D835Y	5	3,25

Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis phát hiện 21 trường hợp *FLT3*-ITD (13,64%), đa dạng về kích thước lặp đoạn, và 5 trường hợp *FLT3*-D835Y (3,25%).

3.3. So sánh hai kỹ thuật trong phát hiện *FLT3*-ITD

Bảng 2. Tỷ lệ đột biến FLT3-ITD

Kỹ thuật	Số lượng	Tỷ lệ %
PCR	21	13,64
NGS	12	7,79

Multiplex PCR phát hiện 21 trường hợp *FLT3*-ITD, trong khi NGS chỉ phát hiện 12 trường hợp. Như vậy, Multiplex PCR phát hiện thêm 9 trường hợp (42,9%).

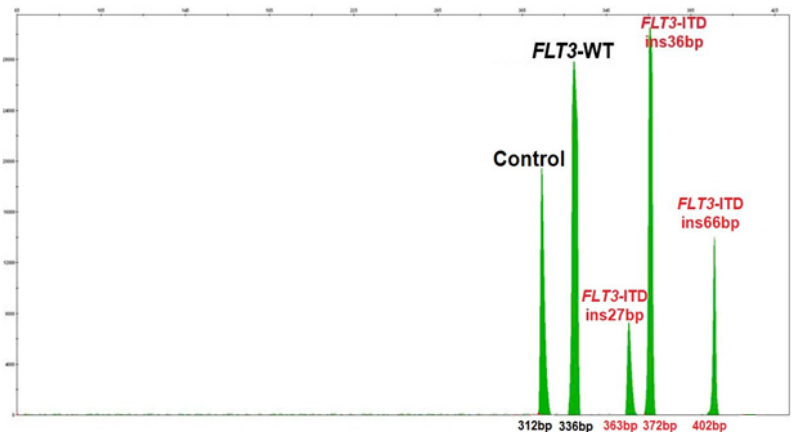
Bảng 3. Các trường hợp FLT3-ITD được phát hiện bằng kỹ thuật Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis nhưng không được phát hiện bằng kỹ thuật NGS

STT	Mã bệnh nhân	Tỷ lệ alen ITD (Fragment analysis)	Kích thước đoạn chèn (bp)
1	AML-24	40,48%	42bp
2	AML-33	5,02%	36bp và 51bp
3	AML-62	59,1%	36bp, 48bp và 60bp
4	AML-82	1,55%	24bp
5	AML-86	1,57%	36bp
6	AML-89	54,86%	27bp, 36bp và 66bp
7	AML-98	1,75%	36bp
8	AML-115	3,29%	72bp
9	AML-133	0,67%	36bp

Trong 9 trường hợp *FLT3*-ITD chỉ được phát hiện bằng Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis, tỉ lệ alen dao động 0,67–59,10%; 5/9 trường hợp (55,6%) dưới 5% và 3/9 (33,3%) trên 40% (bảng 3.3).

Kích thước đoạn chèn dao động 24–72 bp. Có 3/9 trường hợp (33,3%) mang hai hoặc ba ITD, trong đó hai trường hợp có ba ITD. Đa số có ít nhất một đoạn chèn dài ≥ 36 bp.

Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis còn nhận diện nhiều dòng *FLT3*-ITD trên cùng người bệnh (hình 3.1).



Hình 3.1: Đột biến FLT3-ITD phát hiện bằng Multiplex PCR kết hợp Fragment analysis

3.4. So sánh trong phát hiện *FLT3*-D835Y

Bảng 4. Tỷ lệ đột biến FLT3-D835Y

Kỹ thuật	Số lượng	Tỷ lệ %
PCR	5	3,25
NGS	5	3,25

Hai kỹ thuật cùng phát hiện 5 trường hợp *FLT3*-D835Y. NGS còn phát hiện I867T, D835H và p.Ile836del ở 3 bệnh nhân khác, cho thấy khả năng khảo sát rộng hơn ngoài D835Y (hình 3.2).



Hình 3.2: Đột biến D835H và I867T trên vùng TKD gen FLT3 được phát hiện bằng NGS

IV. BÀN LUẬN

Đặc điểm chung

Trong 154 người bệnh được nghiên cứu cho thấy, độ tuổi của người bệnh trong nghiên cứu tập trung chủ yếu ở nhóm trung niên đến cao tuổi, phù hợp với xu hướng chung của AML trên thế giới, trong đó tuổi trung vị thường dao động từ 60–68 tuổi (2). Sự phân bố giới tính giữa nam và nữ trong nghiên cứu là cân bằng. Điều này tương đồng với các báo cáo trước đây cho thấy AML không có sự ưu thế rõ rệt về giới tính, mặc dù một số nghiên cứu ghi nhận tỷ lệ nam có thể cao hơn nhẹ (3).

Tỉ lệ đột biến FLT3

Tỉ lệ *FLT3*-ITD là 13,64%, thấp hơn mức khoảng 20–30% thường được ghi nhận ở bệnh nhân AML (3). Sự khác biệt có thể liên quan đặc điểm quần thể, cơ cấu tuổi, tiêu chuẩn chọn bệnh và phương pháp xét nghiệm; nghiên cứu chưa đủ dữ liệu để xác định đóng góp của từng yếu tố.

Tỉ lệ *FLT3*-D835Y là 3,25% chỉ phản ánh một biến thể, nên không thể so sánh trực tiếp với tỉ lệ chung của *FLT3*-TKD. NGS còn phát hiện I867T, D835H và p.Ile836del ở 3 bệnh nhân khác, cho thấy sự đa dạng biến thể vùng TKD và giá trị bổ sung của xét nghiệm panel (5).

Sự khác biệt giữa Multiplex PCR và NGS trong phát hiện đột biến gen *FLT3*

Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis phát hiện 21 trường hợp *FLT3*-ITD, trong khi NGS phát hiện 12; 9 trường hợp chỉ được phát hiện bằng Multiplex PCR, chiếm 42,9% số trường hợp dương tính bằng phương pháp này ($p < 0,05$). Kết quả này cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa hai kỹ thuật, phản ánh hạn chế của NGS trong phát hiện biến thể mất đoạn hoặc thêm đoạn lớn.

Trong 9 trường hợp NGS không phát hiện, 5 trường hợp có tỉ lệ alen dưới 5%, thấp nhất 0,67%. Ở các biến thể có tỉ lệ alen thấp, số lượng đoạn đọc mang đột biến sau tạo thư viện, giải trình tự và lọc chất lượng có thể không đạt ngưỡng gọi biến thể, làm giảm độ nhạy của NGS. Trong khi đó, multiplex PCR phối hợp Fragment analysis dựa trên sự khác biệt kích thước sản phẩm PCR nên có độ nhạy cao đối với *FLT3*-ITD có tỉ lệ alen thấp. Kết quả này phù hợp với ghi nhận của He và cộng sự (7) và Kim và cộng sự (8).

Ba trường hợp có tỉ lệ alen cao (40,48%; 54,86%; 59,10%) vẫn không được NGS phát hiện, cho thấy tỉ lệ alen không phải yếu tố duy nhất. Có 3/9 trường hợp mang hai hoặc ba ITD; sự đa dòng có thể làm phức tạp quá trình căn chỉnh và gọi biến thể.

Các đoạn chèn bị bỏ sót dài 24–72 bp, gồm một số ITD dài 60–72 bp. Chiều dài và cấu trúc ITD có thể gây cắt ghép, phân tách hoặc căn chỉnh sai, làm giảm số đoạn đọc hỗ trợ biến thể. Đây là một trong những hạn chế của NGS đọc ngắn trong phát hiện *FLT3*-ITD, phù hợp với các nghiên cứu của Lee và cộng sự (4) và Koga và cộng sự (5).

Vị trí chèn, thiết kế probe/amplicon, chiều dài đoạn đọc và thuật toán cũng có thể ảnh hưởng khả năng phát hiện. Một số ITD kéo dài từ vùng cận màng sang TKD1, làm phức tạp phân tích (5). Đối với panel NGS sử dụng phương pháp lai bắt giữ, vị trí ITD, thiết kế probe, chiều dài đoạn đọc và thuật toán phân tích đều có thể ảnh hưởng đến khả năng phát hiện biến thể. He và cộng sự (7) và Kim cùng cộng sự (8) cũng ghi nhận các yếu tố này có vai trò trong hiệu quả phát hiện *FLT3*-ITD bằng NGS. Tuy nhiên, nghiên cứu chưa xác định vị trí chèn của từng ITD nên chưa thể đánh giá trực tiếp mối liên quan này.

Ngược lại, fragment analysis có ưu điểm nhận diện trực tiếp thay đổi kích thước sản phẩm PCR bằng điện di mao quản, không phụ thuộc thuật toán căn chỉnh trình tự (6). Do đó, kỹ thuật này có độ nhạy cao đối với các đột biến dạng chèn đoạn, đặc biệt là *FLT3*-ITD.

Các đột biến *FLT3*-ITD dẫn đến sự hoạt hóa liên tục của thụ thể FLT3, kích hoạt các con đường tín hiệu nội bào như STAT5, PI3K/AKT và MAPK, từ đó thúc đẩy tăng sinh và ức chế apoptosis của tế bào ác tính. Đặc biệt, *FLT3*-ITD có thể tồn tại ở nhiều dạng khác nhau về kích thước và vị trí chèn, góp phần làm tăng tính không đồng nhất của bệnh. Chính sự đa dạng này là một trong những nguyên nhân khiến NGS gặp khó khăn trong phát hiện, do các biến thể không đồng nhất về cấu trúc và có thể vượt quá khả năng nhận diện của thuật toán phân tích. Hơn nữa, đột biến *FLT3*-ITD là một trong những yếu tố tiên lượng quan trọng nhất trong AML. Theo ELN 2022, bệnh nhân có *FLT3*-ITD thường được xếp vào nhóm nguy cơ trung bình hoặc xấu, tùy thuộc vào các đột biến đi kèm (2). Ngoài ra, *FLT3*-ITD còn là mục tiêu điều trị của các thuốc ức chế FLT3. Nghiên cứu RATIFY của Stone và cộng sự năm 2017 cho thấy việc bổ sung midostaurin vào phác đồ điều trị chuẩn giúp cải thiện đáng kể thời gian sống còn ở bệnh nhân AML có đột biến *FLT3* (9). Tương tự, nghiên cứu ADMIRAL của Perl và cộng sự năm 2019 chứng minh hiệu quả của gilteritinib trong điều trị AML tái phát hoặc kháng trị có đột biến *FLT3* (10). Do đó, việc bỏ sót đột biến *FLT3*-ITD có thể dẫn đến phân nhóm nguy cơ sai cho bệnh nhân, bỏ lỡ cơ hội điều trị nhắm trúng đích, ảnh hưởng đến tiên lượng bệnh và kết cục điều trị.

Mặt khác, tỉ lệ đột biến *FLT3*-TKD loại D835Y của nghiên cứu được báo cáo cho thấy sự tương đồng hoàn toàn giữa hai kỹ thuật Multiplex PCR và NGS trong phát hiện. Tuy nhiên, về mặt sinh học phân tử, vùng tyrosine kinase domain của gen *FLT3* không chỉ bao gồm D835Y mà còn một phổ đa dạng các biến thể khác, bao gồm D835V, D835H, D835E, I836T, I836del và các đột biến hiếm hơn ở vùng activation loop (A-loop). Kỹ thuật NGS trong nghiên cứu này ứng dụng có thể phát hiện được tất cả các đột biến vùng TKD. Điều này cho thấy tầm quan trọng của NGS trong phát hiện các đột biến này, đặc biệt là các dòng đột biến nhỏ (minor clone). Các đột biến TKD, đặc biệt tại codon D835, làm thay đổi cấu hình không gian của vùng A-loop, dẫn đến hoạt hóa tự phát của thụ thể FLT3 tương tự như cơ chế của FLT3-ITD, với mức độ hoạt hóa và hậu quả sinh học có thể khác nhau.

Tóm lại, những kết quả của nghiên cứu này đã gợi ý cho chúng tôi đề xuất chiến lược xét nghiệm tối ưu cho đột biến FLT3 bao gồm: phối hợp thực hiện đồng thời NGS panel gen mục tiêu và kỹ thuật Multiplex PCR kết hợp Fragment analysis FLT3, nhằm phát hiện đầy đủ cả các đột biến điểm, mất đoạn, thêm đoạn và các đột biến phức tạp khác với độ nhạy cao, giúp tăng độ chính xác chẩn đoán, hỗ trợ phân nhóm nguy cơ chính xác và tối ưu hóa điều trị cá thể hóa. Đề xuất này cũng phù hợp với các khuyến cáo quốc tế như NCCN và ELN (2).

Ngoài ra, nghiên cứu của chúng tôi còn tồn tại một số hạn chế như chưa đánh giá mối liên quan giữa đột biến *FLT3* và thời gian sống còn và nghiên cứu này là nghiên cứu đơn trung tâm. Do đó, trong tương lai, cần thực hiện các nghiên cứu đa trung tâm với cỡ mẫu lớn hơn, kết hợp phân tích sâu hơn mối liên quan với kết cục lâm sàng.

V. KẾT LUẬN

Multiplex PCR phối hợp Fragment analysis có độ nhạy cao hơn NGS trong phát hiện *FLT3*-ITD, trong khi hai kỹ thuật có độ nhạy tương đương đối với D835Y. Việc phối hợp hai phương pháp là cần thiết trong thực hành lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Khoury JD, Solary E, Abla O, et al.** The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: Myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703–1719.
2. **Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al.** Diagnosis and management of AML in adults: 2022 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2022;140(12):1345–1377.
3. **Short NJ, Rytting ME, Cortes JE.** Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2018;392(10147):593–606.
4. **Lee S, Sun CH, Jang H, et al.** ITDetect: a method to detect internal tandem duplication of FMS-like tyrosine kinase (FLT3) from next-generation sequencing data with high sensitivity and clinical application. *BMC Bioinformatics*. 2023;24(1):62. doi:10.1186/s12859-023-05173-8.
5. **Koga S, Du W, Yang G, Zhang L.** Molecular Testing of FLT3 Mutations in Hematolymphoid Malignancies in the Era of Next-generation Sequencing. *J Clin Transl Pathol*. 2025;5(1):30-40. doi:10.14218/JCTP.2025.00008.
6. **Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, et al.** Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2003;5(2):96–102.
7. **He R, Devine DJ, Tu ZJ, et al.** Hybridization capture-based next generation sequencing reliably detects FLT3 mutations and classifies FLT3-internal tandem duplication allelic ratio in acute myeloid leukemia: a comparative study to standard fragment analysis. *Mod Pathol*. 2020;33(3):334-343. doi:10.1038/s41379-019-0359-9.
8. **Kim JJ, Lee KS, Lee TG, Lee S, Shin S, Lee ST.** A comparative study of next-generation sequencing and fragment analysis for the detection and allelic ratio determination of FLT3 internal tandem duplication. *Diagn Pathol*. 2022;17(1):14. doi:10.1186/s13000-022-01202-x.
9. **Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al.** Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with FLT3 mutation. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(5):454–464.
10. **Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, et al.** Gilteritinib or chemotherapy for relapsed or refractory FLT3-mutated AML. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(18):1728–1740.