

Ứng dụng kỹ thuật array CGH trong chẩn đoán trước sinh một số bất thường nhiễm sắc thể tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

Đinh Thủy Linh¹, Hoàng Hải Yến¹, Phạm Thế Vương¹
 Trần Thị Minh Thu¹, Nguyễn Đức Nghĩa¹, Nguyễn Tài Đức¹, Nguyễn Duy Anh¹
¹Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội

doi: 10.46755/vjog.2022.3.1429

Tác giả liên hệ (corresponding author): Nguyễn Tài Đức; email: taiduc.hmu@gmail.com

Nhận bài (received): 8/9/2022 - Chấp nhận đăng (accepted): 25/9/2022

Tóm tắt

Trong chẩn đoán trước sinh các bất thường nhiễm sắc thể (NST), kỹ thuật nuôi cấy tế bào ối hiện vẫn là tiêu chuẩn vàng. Tuy nhiên, chỉ phát hiện được các bất thường với kích thước > 5 Mb (trên 5 triệu cặp Base). Kỹ thuật array CGH (Microarray-based comparative genomic hybridization) có khả năng đánh giá trên toàn bộ 24 NST giúp phát hiện các bất thường mất cân bằng của NST bao gồm các trường hợp lệch bội, mất hoặc nhân đoạn của NST. Hơn nữa, kỹ thuật array CGH cho phép phát hiện các bất thường của NST ngay cả khi không có định hướng trong chẩn đoán.

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ bất thường một số nhiễm sắc thể qua kỹ thuật array CGH tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.

Đối tượng, phương pháp nghiên cứu: 306 thai phụ có tuổi thai 17 - 28 tuần có chỉ định chọc hút nước ối tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội từ 10/2020 - 09/2021, mẫu nước ối được thực hiện đồng thời 2 kỹ thuật: array CGH và nuôi cấy tế bào ối.

Kết quả: Kỹ thuật karyotype phát hiện được 35/306 (11,4%) bất thường nhiễm sắc thể, trong khi đó array CGH phát hiện được 51/306 (16,7%). Array CGH phát hiện 25 trường hợp bất thường lệch bội, tương đương karyotype. Với các bất thường mất đoạn/nhân đoạn lớn, kỹ thuật array phát hiện được 9 trường hợp, trong khi đó karyotype phát hiện được 8 trường hợp; với các mất đoạn/nhân đoạn nhỏ, array CGH phát hiện được 16 trường hợp trong khi karyotype chỉ phát hiện được 1 trường hợp.

Kết luận: Array CGH là xét nghiệm có độ chính xác cao, phát hiện được các trường hợp bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể ở mức độ mất đoạn/nhân đoạn nhỏ mà kỹ thuật karyotype không phát hiện được.

Từ khóa: array CGH, chẩn đoán trước sinh, bất thường nhiễm sắc thể.

Implementation of array CGH in prenatal diagnosis chromosomal abnormality in Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital

Đinh Thủy Linh¹, Hoàng Hải Yến¹, Phạm Thế Vương¹,
 Trần Thị Thu Minh¹, Nguyễn Đức Nghĩa¹, Nguyễn Tài Đức¹, Nguyễn Duy Anh¹
¹Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital

Abstract

The karyotype is still the gold standard in the prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities, but only abnormalities with size > 5 Mb (over 5 million Base pairs) can be detected. The array CGH (Microarray-based comparative genomic hybridization) can evaluate all 24 chromosomes to help detect chromosomal imbalance abnormalities, including cases of aneuploidy, loss, or duplication of chromosomes. Furthermore, the array CGH technique detects chromosomal abnormalities even when there is no diagnostic orientation.

Aim: Determination of abnormal rates of some chromosomes through CGH array technique at Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital.

Method: 306 pregnant women with a gestational age of 17 - 28 weeks were indicated for amniocentesis at Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital from October 2020 to September 2021, amniotic fluid samples were performed simultaneously with 2 techniques: CGH array and karyotype.

Results: The karyotype technique detected 35/306 (11.4%) chromosomal abnormalities, while the CGH array detected 51/306 (16.7%). Array CGH detected 25 aneuploidy cases, equivalent to karyotype. For large deletion/multiplication abnormalities, array detected 9 cases, while karyotype detected 8 cases; with small deletions/multiplications, array CGH detected 16 cases while karyotype detected only 1 case.

Conclusion: Array CGH is a highly accurate test that detects structural chromosomal abnormalities at the level of small deletions/duplications that karyotype techniques cannot see.

Keywords: array CGH, prenatal diagnosis, aneuploidy.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong các bất thường bẩm sinh thì hiện nay bất thường nhiễm sắc thể (NST) vẫn là một vấn đề lớn nhận được nhiều sự quan tâm trong ngành sản phụ khoa thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng do những biểu hiện nặng nề, đặc biệt là đa dị tật về hình thái, chậm phát triển trí tuệ và không có biện pháp điều trị đặc hiệu. Trên thế giới các chương trình sàng lọc chẩn đoán trước sinh đã và đang được phát triển mạnh mẽ nhằm chẩn đoán sớm các trường hợp bất thường nhiễm sắc thể, từ đó đưa ra tư vấn di truyền với từng trường hợp cụ thể, đặc biệt là dừng thai nghén sớm theo nguyện vọng của gia đình với những trường hợp thai nhi mắc bất thường di truyền nặng như hội chứng Edwards, hội chứng Patau, hội chứng Down,... hơn nữa, kỹ thuật array CGH (Microarray-based comparative genomic hybridization) cũng cho phép phát hiện các trường hợp mất hoặc nhân đoạn của NST với độ phân giải cao hơn nhiều so với phương pháp lập karyotype [1]. Nuôi cấy tế bào ối hiện nay vẫn là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán trước sinh các bất thường nhiễm sắc thể, tuy nhiên hạn chế của phương pháp này là có thể bỏ sót các trường hợp vi mất đoạn nhiễm sắc thể và thời gian trả kết quả kéo dài (3 tuần), do đó sự phát triển mạnh mẽ của các kỹ thuật sinh học phân tử trong thời gian gần đây đã giúp cho việc chẩn đoán và phát hiện sớm các bất thường NST 13, 18, 21, X và Y chỉ sau 24 - 48 giờ, như kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (Fluorescence in situ hybridization - FISH), phản ứng chuỗi huỳnh quang định lượng (quantitative fluorescence PCR - QF-PCR) và kỹ thuật sử dụng mẫu dò đặc hiệu được khuếch đại từ phản ứng PCR (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MLPA) [2]. Và đặc biệt sự ra đời của kỹ thuật array CGH là một bước tiến vượt bậc không chỉ phát hiện các đột biến lệch bội NST mà còn có khả năng phát hiện các bất thường của NST ngay cả khi không có định hướng trong chẩn đoán, đây là một ưu thế của array CGH. Qua nghiên cứu này chúng tôi nhằm xác định tỷ lệ bất thường một số nhiễm sắc thể qua kỹ thuật array CGH tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội trong năm 2020 - 2021.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu là những thai phụ tuổi thai từ 17 - 28 tuần đến khám thai tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội có chỉ định chọc hút nước ối và tự nguyện chọc ối làm xét nghiệm nhiễm sắc thể qua nuôi cấy tế bào ối và xét nghiệm array CGH.

Chỉ định chọc hút nước ối:

- Mẹ ≥ 35 tuổi.
- Sàng lọc huyết thanh mẹ (Combined test, triple test) nguy cơ cao.
- Sàng lọc NIPT (Non-Invasive prenatal testing) nguy cơ cao.
- Siêu âm thai có bất thường hình thái.

Nguyên lý kỹ thuật:

Kỹ thuật array CGH thực hiện việc so sánh mẫu DNA cần phân tích với mẫu DNA chứng thông qua sự khác

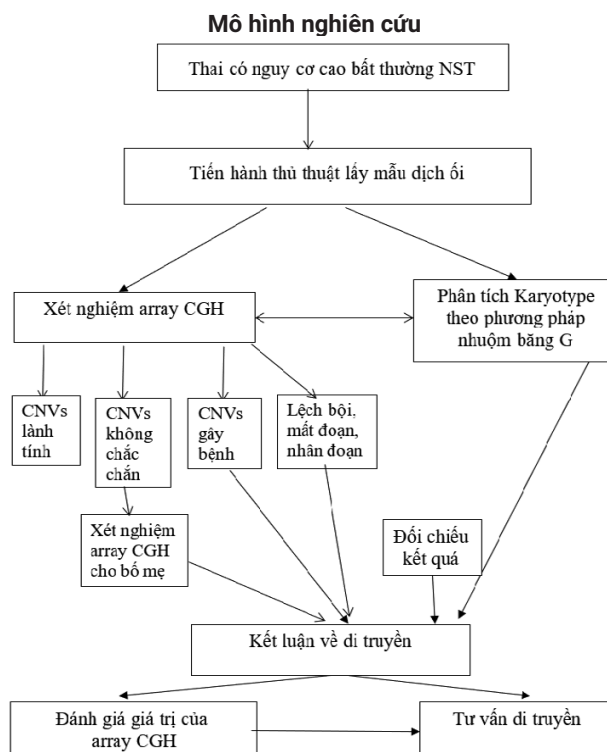
biệt giữa 2 DNA này để phát hiện các trường hợp mất đoạn hay nhân đoạn nếu có trên DNA. Nguyên lý của kỹ thuật array CGH được dựa trên khả năng bắt cặp (base pair) hoặc còn được gọi một cách khác là lai (hybridise) giữa một mạch đơn của DNA này và một mạch đơn của DNA khác theo nguyên tắc bổ sung. Kỹ thuật array CGH có khả năng đánh giá trên toàn bộ 46 NST chỉ trong một xét nghiệm duy nhất giúp phát hiện các bất thường mất cân bằng của NST.

Trong kĩ thuật array CGH, hàng ngàn đoạn ngắn DNA (còn gọi là các đoạn dò) được sắp xếp một cách chính xác tại những vị trí nhất định trên lam kính thành 1 hệ thống lưới gọi là array. Đầu tiên mẫu DNA cần phân tích (mẫu bệnh nhân) sẽ được cắt thành những đoạn ngắn, Mẫu bệnh nhân và mẫu chuẩn được đánh dấu bằng hai chất phát huỳnh quang khác nhau (Cy3, Cy5). Sau đó 2 mẫu DNA này sẽ được trộn lẫn với nhau và cho lên array để tiến hành lai với các đoạn dò (probe) tương ứng được gắn cố định trên giá thể array.

Số lượng các probe thay đổi theo độ phân giải của bộ sinh phẩm sử dụng. Số lượng probe càng nhiều, độ phân giải của kỹ thuật càng cao. Các probe này được thiết kế dọc theo chiều dài của các NST.

Mẫu bệnh nhân và mẫu chuẩn, sau khi lai với probe được rửa để loại bỏ các đoạn không lai trước khi đọc trên máy Scan.

Sau khi lai, tín hiệu huỳnh quang được đọc bằng máy quét Micro-array. Cường độ huỳnh quang phát ra từ các array của bệnh nhân sẽ được so sánh với của mẫu chứng, từ đó xác định sự thay đổi số lượng vật liệu di truyền tại các vị trí khảo sát.



3. KẾT QUẢ

Nghiên cứu thu thập được 306 đối tượng phù hợp từ 10/2020 - 09/2021, chúng tôi thu được một số kết quả như sau:

Bảng 1. Bảng phân loại chỉ định chọc hút nước ối

Chỉ định xét nghiệm dịch ối	Số lượng	Tỷ lệ %
Bất thường hình thái siêu âm	246	80,4
Sàng lọc huyết thanh mẹ (SLHTM) nguy cơ cao	18	5,9
Sàng lọc NIPT nguy cơ cao	24	7,8
Tiền sử sinh con/mang thai dị tật	8	2,6
Bố hoặc mẹ là người có bất thường nhiễm sắc thể	2	0,7
Bất thường siêu âm + SLHTM nguy cơ cao	1	0,3
Bất thường siêu âm + sàng lọc NIPT nguy cơ cao	5	1,6
Bất thường siêu âm + tiền sử sinh con dị tật	2	0,7
Tổng	306	100

Nhận xét: Trong nhóm thai phụ được chỉ định làm xét nghiệm dịch ối, nhóm thai phụ có bất thường hình thái trên siêu âm của thai chiếm tỷ lệ cao nhất.

Bảng 2. Tỷ lệ phát hiện bất thường di truyền của 2 phương pháp theo loại bất thường

Loại bất thường	Array CGH phát hiện	Karyotype phát hiện
Lệch bội	25	25
Mất đoạn/Nhân đoạn lớn ($\geq 5\text{Mb}$)	9	8
Mất đoạn/Nhân đoạn nhỏ ($< 5\text{Mb}$)	16	1
Khảm	1	1
Tổng	51	35

Nhận xét: Với các trường hợp mất đoạn nhân đoạn nhỏ, kỹ thuật array CGH phát hiện 51/306 (16,7%) trường hợp, trong khi đó Karyotype chỉ phát hiện được 35/306 (11,4%) trường hợp.

Bảng 3. Tỷ lệ phát hiện bất thường di truyền của 2 phương pháp phân theo chỉ định xét nghiệm dịch ối

Lý do XN dịch ối	n	Số bất thường array	Số bất thường karyotype	Tỷ lệ phát hiện tăng thêm	OR
Sàng lọc huyết thanh mẹ (SLHTM) nguy cơ cao	18	1	1	0%	1
Sàng lọc NIPT nguy cơ cao	24	5	5	0%	1
Tiền sử sinh con/mang thai dị tật	8	1	1	0%	1
Bố hoặc mẹ là người có bất thường nhiễm sắc thể	2	0	0	0%	nd
Bất thường hình thái siêu âm	246	38	22	6,5%	1,86
Bất thường siêu âm + SLHTM nguy cơ cao	1	0	0	0%	nd
Bất thường siêu âm + sàng lọc NIPT nguy cơ cao	5	5	5	0%	1
Bất thường siêu âm + tiền sử sinh con dị tật	2	1	1	0%	1
Tổng	306	51	35		

Nhận xét: Với nhóm xét nghiệm dịch ối vì bất thường trên siêu âm array phát hiện được 44/254 (17,3%), tăng 6,3% so với karyotype 28/254 (11,0%).

4. BÀN LUẬN

Chỉ định chọc hút nước ối làm xét nghiệm chẩn đoán bất thường NST của 306 bệnh nhân được phân loại trong bảng 1. Chỉ định lấy mẫu dịch ối làm xét nghiệm array trong nghiên cứu do bất thường hình thái trên siêu âm chiếm tỉ lệ cao với 83,7% (bao gồm 80,4% chỉ có bất thường siêu âm và 3,3% bất thường siêu âm phối hợp với các lý do khác). Theo khuyến cáo của các tổ chức, hiệp hội như Hiệp hội Di truyền học và Gen học Hoa Kỳ - ACMG (The American College of Medical Genetics and Genomics), kỹ thuật array CGH là lựa chọn đầu tay khi chẩn đoán trước sinh trong các trường hợp:

- Thai nhi có bất thường hình thái phát hiện trên siêu âm.
- Tiền sử sinh con bất thường nhiễm sắc thể.
- Bố mẹ mang đột biến NST ở dạng cân bằng như chuyển đoạn, đảo đoạn.

Bảng 2 cho thấy ưu điểm của kỹ thuật array CGH so với kỹ thuật Karyotype trong phát hiện các mất đoạn/nhân đoạn nhỏ. So với karyotype, xét nghiệm array giúp phát hiện thêm 5,3% các bất thường nhiễm sắc thể, gấp 1,5 lần so với xét nghiệm karyotype. Karyotype được thực hiện tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội với kỹ thuật nhuộm băng G độ phân giải của NST nằm trong giới hạn từ 400 - 550 băng trên bộ nhiễm sắc thể đơn bội với kích thước mỗi băng trung bình 5Mb. Do đó kỹ thuật này chỉ cho phép phát hiện các bất thường có kích thước lớn hơn 5 Mb. Về lý thuyết các lệch bội và mất đoạn/nhân đoạn ≥ 5 Mb karyotype sẽ phát hiện được, < 5 Mb sẽ không phát hiện được. Tuy nhiên, độ phân giải băng ngưỡng 5 Mb chỉ mang tính chất tương đối. Việc nhận định kết quả karyotype còn phụ thuộc nhiều yếu tố như kỹ thuật nhuộm băng, khả năng phân tích và nhận định của bác sĩ di truyền.

Giá trị của array CGH trong phát hiện các biến dị số lượng bản sao (Copy Number Variation - CNVs) gây bệnh có liên quan chặt chẽ đến lý do xét nghiệm dịch ối. Các trường hợp xét nghiệm dịch ối vì thai phụ có nguy cơ cao Combined test, Triple test hay sàng lọc NIPT nguy cơ cao hay tiền sử mang thai sinh con dị tật thì kỹ thuật array CGH không phát hiện được thêm bất thường nào so với nuôi cấy tế bào ối. Các nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn cũng cho thấy phát hiện các CNVs bệnh lý ở nhóm này rất thấp. một nghiên cứu tổng hợp đánh giá giá trị của array trên 10614 thai nhi từ 10 nghiên cứu lớn cho thấy, array CGH phát hiện thêm 0,89% các CNVs gây bệnh (clinically significant CNVs) [3].

Ngược lại với nhóm xét nghiệm dịch ối vì bất thường trên siêu âm array phát hiện được 44/254 (17,3%), tăng 6,3% so với karyotype 28/254 (11,0%). Tương tự như nghiên cứu trên 1.033 thai nhi có dị thường siêu âm, Srebnik và cộng sự đã báo cáo phát hiện CNV gây bệnh trong 5,5% trường hợp [4]. Một nghiên cứu lớn hơn phát hiện CNV gây bệnh với tỷ lệ 6,6% trong 2462 trường hợp có bất thường siêu âm [5]. Như vậy, array CGH nên

là xét nghiệm ưu tiên hàng đầu để phát hiện các bất thường nhiễm sắc thể trong chẩn đoán trước sinh các trường hợp có bất thường hình thái siêu âm. Điều này đã được khuyến cáo trong các hiệp hội lớn trên thế giới như ACMG, Hội Sản phụ khoa Canada (The society of obstetricians and gynaecologists of Canada - SOGC), Hiệp hội Di truyền y khoa Canada (Genetics Society of Canada - GSC),...

5. KẾT LUẬN

Hiện nay kỹ thuật array CGH là kỹ thuật hiệu quả nhất cho phép phân tích một cách toàn diện bộ NST, xác định chính xác các bất thường NST, phát hiện các gen liên quan đến những bệnh cảnh điển hình giúp cho việc đánh giá, theo dõi và điều trị hiệu quả hơn. Tuy nhiên, một số hạn chế của kỹ thuật array CGH so với Karyotype bao gồm không phát hiện được đa bội thể, chuyển đoạn cân bằng và các trường hợp bất thường có tỷ lệ khảm thấp, do vậy cần được tiến hành song song cùng kỹ thuật nuôi cấy tế bào ối để có được những chẩn đoán chính xác nhất các rối loạn di truyền ở thai nhi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med*. 2012;367(23):2175-84.
2. Vialard F, Simoni G, Aboura A, De Toffol S, Molina Gomes D, Marcato L, et al. Prenatal BACs-on-Beads™ : a new technology for rapid detection of aneuploidies and microdeletions in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*. 2011;31(5):500-8.
3. Srebnik MI, Joosten M, Knapen M, Arends LR, Polak M, van Veen S, et al. Frequency of submicroscopic chromosomal aberrations in pregnancies without increased risk for structural chromosomal aberrations: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018;51(4):445-52.
4. Srebnik MI, Diderich KE, Joosten M, Govaerts LC, Knijnenburg J, de Vries FA, et al. Prenatal SNP array testing in 1000 fetuses with ultrasound anomalies: causative, unexpected and susceptibility CNVs. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(5):645-51.
5. Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW, et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenat Diagn*. 2012;32(10):976-85.