

PHÁT HIỆN BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ TRONG CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH: KARYOTYPE HAY MICROARRAY

ThS. Phan Thị Thu Giang¹, PGS. TS. Trần Danh Cường^{1,2},
PGS. TS. Hoàng Thị Ngọc Lan^{1,2}, TS. Đoàn Thị Kim Phượng^{1,2}

¹Bệnh viện Phụ Sản Trung Ương, ²Đại học Y Hà Nội

TỔNG QUAN

Chẩn đoán trước sinh bất thường nhiễm sắc thể đã được đưa ra từ giữa những năm 1970, chủ yếu với mục đích phát hiện bất thường dị bội và bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể. Kỹ thuật karyotype được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán di truyền trước sinh. Tuy nhiên, kỹ thuật này vẫn tồn tại các hạn chế như độ phân giải chỉ phát hiện được các bất thường số lượng, cấu trúc nhiễm sắc thể có kích thước lớn trên 5 Mb và tế bào cần được nuôi cấy dài ngày^[1]. Theo thời gian, những tiến bộ công nghệ kỹ thuật y sinh đã cho ra đời các kỹ thuật có thể phát hiện các bất thường di truyền ở mức độ nhỏ hơn. Một trong các kỹ thuật đó là phân tích microarray nhiễm sắc thể (CMA – Chromosomal microarray analysis).

Kỹ thuật CMA không những phát hiện được dị bội nhiễm sắc thể mà còn là kỹ thuật có độ phân giải cao có khả năng phát hiện mất đoạn nhỏ và nhân đoạn nhỏ của toàn bộ 23 cặp nhiễm sắc thể^[2]. Tùy thuộc vào phương pháp sử dụng, kỹ thuật CMA có thể phát hiện thêm được các trường hợp khảm với các mức độ khác nhau, hai nhiễm sắc thể cùng nguồn gốc từ bố hoặc mẹ (UPD – Uniparental disomy)^[3,4]. Từ lâu, CMA đã được sử dụng để đánh giá chậm phát triển ở trẻ em, rối loạn phổ tự kỷ, bất thường bẩm sinh, và đã được chứng minh làm tăng 15% khả năng chẩn đoán trong những trường hợp như vậy so với phương pháp lập karyotype truyền thống^[1].

Ở Việt Nam, CMA là kỹ thuật còn khá mới mẻ. Đối với chẩn đoán trước sinh, khả năng phát hiện bất thường di truyền của CMA vẫn còn chưa được thống kê đầy đủ. Liệu rằng CMA có thực sự hữu ích trong chẩn đoán di truyền trước sinh? Nếu đã có kỹ thuật CMA, các xét nghiệm di truyền với độ phân giải thấp hơn CMA như karyotype có cần thiết được sử dụng?

Kỹ thuật karyotype

Phương pháp karyotype dựa trên phân tích số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể dựa trên bộ nhiễm sắc thể của tế bào có nhân ở kỳ giữa (metaphase) hoặc tiền kỳ giữa (pro-metaphase) để lập bản đồ nhiễm sắc thể theo danh pháp di truyền quốc tế. Trong chẩn đoán trước sinh, các tế bào thường được dùng để xét nghiệm là tế bào dịch ối, tế bào tua rau hoặc tế bào máu cuống rốn. Các tế bào này trải qua một quá trình nuôi cấy trong khoảng 7 – 10 ngày để tăng số lượng tế bào kỳ giữa. Sau đó, nhiễm sắc thể kỳ giữa được thu hoạch và nhuộm. Kỹ thuật nhuộm band G thường dùng nhất để phân tích bất thường nhiễm sắc thể. Nhiễm sắc thể được nhuộm bằng G thường có độ phân giải nằm trong giới hạn từ 350 – 850 băng, với kích thước mỗi băng từ 5 – 10 Mb. Phương pháp karyotype đánh giá được toàn bộ bộ nhiễm sắc thể, cả về bất thường số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể có kích thước trên 5 – 10 Mb. Với các bất thường nhiễm sắc thể nhỏ hơn 5 Mb vẫn có thể gây những hậu

quả lâm sàng rõ ràng nhưng karyotype không thể phát hiện được. Hơn nữa, để thực hiện kỹ thuật này cần nhân lực được đào tạo chuyên sâu; thời gian nuôi cấy dài ngày làm kéo dài thời gian trả kết quả; làm tăng nguy cơ nhiễm trùng mẫu cấy; làm tăng nguy cơ phát sinh đột biến trong quá trình nuôi cấy và có nguy cơ gặp các tế bào không phát triển tốt trong môi trường nuôi cấy gây khó khăn trong quá trình nuôi cấy và chẩn đoán^[5].

Kỹ thuật phân tích microarray nhiễm sắc thể (CMA)

CMA là phương pháp xác định thêm hoặc mất vật chất di truyền dựa trên nguyên lý lai các đoạn dò oligo hoặc SNP ở mẫu bệnh rồi so sánh với các mẫu chứng. Ưu điểm của các phương pháp CMA không chỉ xác định lệch bội nhiễm sắc thể và thay đổi lớn trong cấu trúc nhiễm sắc thể giống như kỹ thuật karyotype, mà còn phát hiện các bất thường dưới mức phát hiện của kính hiển vi (mất đoạn nhỏ hoặc nhân đoạn nhỏ nhiễm sắc thể) thông qua các biến thể số lượng bản sao (copy number variants – CNVs) mà các phương pháp truyền thống không phát hiện được. CNVs là những đoạn DNA dài ít nhất 1.000 cặp base có các đoạn lặp khác nhau. Các CNVs gây bệnh có thể giải thích cho một tỷ lệ lớn bệnh tật di truyền nặng nề của con người, ước tính tới 15%^[6].

Các loại microarray thế hệ đầu tiên sử dụng đoạn dò là các dòng nhiễm sắc thể vi khuẩn nhân tạo (Bacterial Artificial Chromosome – BAC). Các microarray thế hệ sau sử dụng oligonucleotide (oligo – đoạn nucleotide ngắn của người) làm đoạn dò và hiện được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới. Kỹ thuật BAC array và oligo CGH đều dựa trên kỹ thuật lai các oligo so sánh. Kỹ thuật SNP array dựa trên sự khác biệt giữa hai alen SNP (A hoặc B) cho vị trí cụ thể trong kiểu gen. SNP microarray là thế hệ mới nhất trong các nền tảng microarray, có ưu thế hơn cả trong việc phát hiện các CNV, có khả năng phát hiện thêm các SNP, các trường hợp đa

bội, LOH, UPD^[7]. Nền tảng SNP-array là phương pháp microarray phát hiện các CNVs dựa trên các SNP nên SNP-array không những phát hiện được lệch bội, các bất thường nhỏ mà còn có thể phát hiện được đa bội, UPD, LOH. Kết quả được đánh giá khách quan thay vì chủ quan, kết quả dữ liệu được so sánh với trình duyệt và cơ sở dữ liệu bộ gen^[5]. Tuy nhiên, kỹ thuật microarray vẫn còn hạn chế như không phát hiện được các đột biến đơn nucleotide hoặc đột biến thêm/mất dưới 20 nucleotide; không phát hiện được chuyển đoạn cân bằng, chuyển đoạn cân bằng hiếm khi gây bệnh trừ khi có sự phá vỡ gen quan trọng. Microarray không phát hiện được khám mức độ thấp ở thai, như bất kỳ kỹ thuật chẩn đoán trước sinh khác, sự hiện diện hoặc vắng mặt khám ở thai có thể không đại diện cho mức độ khám trong máu ngoại vi, tuyến sinh dục hoặc các mô khác. Một số loại array không có khả năng phát hiện đa bội. Đột biến điểm, độ biểu hiện của gen, bất thường methyl hóa cũng không được xác nhận bằng microarray cũng như bằng karyotype^[5,8].

CMA trong chẩn đoán bất thường di truyền trước sinh

Phương pháp microarray phát hiện các bất thường di truyền dựa vào phân tích các CNVs từ nhiều loại mô nuôi cấy hoặc không cần qua nuôi cấy (DNA được phân tách từ tế bào ối, tua rau, máu, mô thai, mô đúc paraffin...). Một số nghiên cứu quy mô lớn cho thấy CMA làm tăng phát hiện bất thường di truyền trong chẩn đoán trước sinh. Trong một nghiên cứu năm 2012 của Wapner RJ và cộng sự, CMA phát hiện thêm 6% các bất thường di truyền mà karyotype không phát hiện được ở những thai có siêu âm bất thường^[9]. Srebniak và cộng sự thực hiện SNP-array trên 1.033 trường hợp có bất thường trên siêu âm và phát hiện 57 (5,5%) trường hợp bất thường di truyền có khả năng gây bệnh mà karyotype bình thường^[10]. Trong một nghiên cứu lớn với 5.000 trường hợp, trong đó 2.462 trường hợp có bất thường siêu âm, microarray

phát hiện thêm so với karyotype là 6,6% ở dạng bất thường thuần tập. Một phân tích tổng hợp của Hillman và cộng sự phát hiện CMA bổ sung thêm 7 – 10% so với karyotype trong trường hợp bất thường cấu trúc trên siêu âm thai^[5]. Với một số bất thường thai nhi đơn lẻ, CMA đã chứng minh là cung cấp thêm khả năng chẩn đoán so với karyotype và cũng được khuyến cáo trong những tình huống như vậy. Phân tích tổng hợp về CMA chỉ ra những trường hợp có các bất thường đơn độc cho thấy tỷ lệ các biến thể gây bệnh ~5%. Các trường hợp CMA cho kết quả dương tính ở bất thường đơn độc là hệ thần kinh trung ương (~6%), hệ tiêu hóa (~7%), cơ xương khớp (~8%) và hệ tim mạch (~7%)^[11,12]. Tỷ lệ phát hiện những biến thể gây bệnh cao hơn (>8%) đã được quan sát với các dị tật đơn độc bao gồm không phân chia não trước, thiếu sản tiểu não, thiếu sản tim trái, khe hở môi, khe hở vòm miệng và thoát vị rốn. Ngược lại, kết quả CMA bất thường trên thai có dị tật đơn độc khác (thông liên thất, khe hở thành bụng, bất sản thận và tắc nghẽn niệu quản đoạn thấp) không được báo cáo. Tuy nhiên, khi bất thường cấu trúc đơn độc kết hợp với bất thường khác trên siêu âm, tần suất kết quả CMA gây bệnh cao hơn, đặc biệt là với thai chậm phát triển trong tử cung hoặc phát triển quá mức (13,6%) hoặc thể tích nước ối bất thường (9,1%). Tăng khoảng sáng sau gáy (NT) $\geq 3,5\text{mm}$, hoặc > BPV thứ 99, có liên quan đến tăng nguy cơ lệch bội cũng như làm tăng nguy cơ mắc một số hội chứng và bất thường cấu trúc khác. Một phân tích tổng hợp gần đây sử dụng CMA với NT tăng và karyotype bình thường chứng tỏ năng suất chẩn đoán tăng trong khoảng 4% (trong trường hợp tăng khoảng sáng sau gáy đơn độc) và 7% (trong trường hợp kèm các dị tật khác)^[1].

Trong nghiên cứu của Jingjing Xiang và cộng sự năm 2020, dựa trên 5.000 trường hợp được thực hiện bằng SNP-array thì có 1.055 trường hợp có bất thường trên siêu âm. Tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể được phát hiện bởi SNP-array đối với nhóm có bất thường cấu trúc ở nhiều hệ

thống (20/38, 52,6%) là cao nhất và tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể ở nhóm có bất thường của một soft marker đơn lẻ (55/458, 12,0%) là thấp nhất. Trong nhóm có bất thường cấu trúc ở một cơ quan thì bất thường tại hệ thống tim mạch là bất thường phổ biến nhất (206/411, 50,1%), trong đó, SNP-array phát hiện 14,6% (30/206), tiếp theo là bất thường hệ niệu – sinh dục (62/411, 15,1%) với 11,3% (7/62) bất thường nhiễm sắc thể. Trong nhóm bất thường một soft marker đơn độc, tăng khoảng sáng sau gáy hoặc nếp gấp da gáy dày là bất thường phổ biến nhất (173/458, 37,8%) với 13,3% (23/173) bất thường nhiễm sắc thể, bất sản xương sống mũi (130/458, 28,4%) với 11,5% (15/130) bất thường nhiễm sắc thể. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể hoặc tam bội nhiễm sắc thể trong các trường hợp có 3 soft marker (giãn não thất nhẹ, bất sản xương sống mũi, tăng khoảng sáng sau gáy hoặc nếp gấp da gáy dày) là 6,3% (21/334), trong khi tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể hoặc tam bội nhiễm sắc thể trong các trường hợp có một soft marker duy nhất là 2,4% (3/124). Nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (6,3% so với 2,4%, kiểm định chi-square, $P = 0,09881$)^[13].

Theo nghiên cứu của Jingjing Xiang và cộng sự năm 2020, phân tích trên 1.784 phụ nữ mang thai từ 35 tuổi trở lên và độ tuổi trung bình là 37,65 (phạm vi 35 – 49 tuổi). Trong đó, 193 trường hợp SNP-array phát hiện bất thường NST (193/1.784, 10,8%), trong đó có 74 trường hợp lệch bội (74/1.784, 4,1%), 10 trường hợp LOH (10/1.784, 0,6%) và 109 trường hợp CNV (109/1.784, 6,1%). Theo nghiên cứu, tỷ lệ lệch bội tăng lên đáng kể theo tuổi, trong khi tỷ lệ CNV không có xu hướng như vậy^[13].

Hiện nay, NIPT dựa trên giải trình tự toàn bộ bộ gen có thể được phát hiện được lệch bội và CNVs trên toàn bộ gen với kích thước >10 Mb. Nghiên cứu của Jingjing Xiang và cộng sự, SNP-array được thực hiện để xác minh kết quả NIPT bất thường (bao gồm lệch bội NST và CNV) của 515 mẫu, có 190 mẫu (190/515, 36,9%) được xác định có bất thường NST, bao

gồm 116 trường hợp lệch bội (116/515, 22,5%), 3 trường hợp LOH (3/515, 0,6%), và 71 trường hợp CNV (71/515, 13,8%)^[13]. Vì mất đoạn nhỏ và nhân đoạn nhỏ không liên quan đến tuổi mẹ, những phụ nữ trẻ có khả năng mang thai có bất thường mất đoạn nhỏ hoặc nhân đoạn nhỏ NST cao hơn hội chứng Down. Nghiên cứu thực hiện trên 2.779 trường hợp thực hiện aCGH, 44% được microarray phát hiện mà NIPT bình thường. Ngoài ra, phụ nữ trên 35 tuổi có kết quả sàng lọc huyết thanh nguy cơ cao hoặc tăng KSSG vẫn có nguy cơ CNVs hoặc các trisomy hiếm mặc dù kết quả NIPT âm tính^[5].

CMA có nhiều ưu điểm hơn so với karyotype trong lĩnh vực chẩn đoán trước sinh, CMA đưa ra nhiều thông tin di truyền hơn vì độ phân giải cao hơn. Ngoài ra, DNA có thể được lấy từ các mẫu không qua nuôi cấy, kết quả nhanh hơn so với karyotype và không yêu cầu tế bào phân chia; CMA của mô thai (dịch ối, nhau thai, sản phẩm của quá trình thụ thai) được khuyến cáo trong việc đánh giá thai chết trong tử cung hoặc thai chết lưu vì xét nghiệm khả năng phát hiện các bất thường gây bệnh. Một nghiên cứu thuần tập lớn năm 2012 được hỗ trợ bởi Viện Quốc Gia về Sức khỏe Trẻ em và Phát triển Con người Eunice Kennedy Shriver (NICHD) so sánh hiệu quả của CMA với karyotype trong chẩn đoán trước khi sinh. Trong nghiên cứu này, CMA phát hiện được tất cả các lệch bội có ý nghĩa lâm sàng và chuyển đoạn không cân bằng được chẩn đoán bằng karyotype, phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Ngoài ra, CMA phát hiện thêm ở thai nhi có bất thường siêu âm và xét nghiệm sàng lọc nguy cơ cao tương ứng là 6%; 1,7% bất thường có ý nghĩa lâm sàng và có kết quả karyotype bình thường Đáng lưu ý, nghiên cứu này đã xác định VOUS ở 3,4% bệnh nhân, trong đó 1,8% được phân loại là có khả năng lành tính – likely benign và 1,6% là có khả năng gây bệnh – likely pathogenic dựa trên dữ liệu có sẵn tại thời điểm nghiên cứu được tiến hành. Khi các biến thể này được phân tích lại thì chỉ 1,5% được phân loại là VOUS. Một nghiên cứu

thực tế sau đó đã chứng minh một tỷ lệ tương tự là 1,6%^[8].

Theo nghiên cứu của Jingjing Xiang và cộng sự, karyotype được thực hiện đồng thời trên 4.022 mẫu (4.022/5.000, 80,4%). Trong số này, 151 trường hợp lệch bội và 2 trường hợp tam bội (69, XXX) đều được xác định bằng karyotype và SNP-array. Trong số 3.665 trường hợp có karyotype bình thường, SNP-array cho kết quả 286 bất thường (286/3665, 7,8%) bao gồm 2 trường hợp khảm 45, X, 19 trường hợp LOH và 265 trường hợp vi lặp đoạn và vi mất đoạn, kích thước 278 CNV dao động từ 99 Kb đến 6.287 Mb. 19 trường hợp khảm được xác định bằng karyotype, 6 trường hợp không được phát hiện bằng SNP-array bao gồm 3 trường hợp lệch bội khảm mức độ thấp và 3 trường hợp chuyển đoạn cân bằng thể khảm, trong khi SNP-array cũng phát hiện thêm 1 trường hợp LOH và 1 trường hợp vi lặp đoạn. Trong số 185 trường hợp có sự sắp xếp lại cấu trúc được phát hiện bằng karyotype, 147 trường hợp bao gồm chuyển đoạn cân bằng, đa hình nhiễm sắc thể và marker không được phát hiện bởi SNP-array. Tuy nhiên, SNP-array cũng phát hiện thêm 1 trường hợp khảm trisomy 22 và 10 trường hợp vi lặp đoạn hoặc vi mất đoạn nhiễm sắc thể^[13].

KẾT LUẬN

CMA có khả năng xác định mất đoạn nhỏ và nhân đoạn nhỏ nhiễm sắc thể mà không thể xác định bằng karyotype. Những CNV có ý nghĩa lâm sàng xuất hiện trong 1% đến 1,7% các trường hợp và không liên quan đến tuổi mẹ. Trong các trường hợp siêu âm bất thường, CNV có ý nghĩa lâm sàng được thấy trong khoảng 6% mà karyotype không phát hiện được. Thai có càng nhiều bất thường hình thái phối hợp, khả năng bất thường CNVs càng cao. Như vậy, CMA được khuyến nghị cho tất cả các trường hợp có bất thường trên siêu âm phải làm xét nghiệm xâm lấn như chọc dò dịch ối hoặc sinh thiết tua rau. Những người được chỉ định chọc ối cho các chỉ định khác, chẳng hạn như tuổi

mẹ, lo lắng và sàng lọc huyết thanh bất thường, nên được tư vấn microarray như một lựa chọn. Đối với bệnh nhân làm xét nghiệm CMA, tư vấn di truyền trước khi làm xét nghiệm là bắt buộc để họ hiểu những lợi ích và hạn chế của xét nghiệm. Đối trường hợp có kết quả CMA bất thường, bao gồm cả những bệnh nhân có VOUS, tư vấn kết quả được tiến hành bởi bác sĩ di truyền chuyên khoa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. C. M. Armour et al, Practice guideline: joint CCMG-SOGC recommendations for the use of chromosomal microarray analysis for prenatal diagnosis and assessment of fetal loss in Canada. Journal of Medical Genetics, pp. 215–221, 2018.
2. UM. Reddy et al, Karyotype versus microarray testing for genetic abnormalities after stillbirth. NICHD Stillbirth Collaborative Research Network, pp. 85–93, 2012.
3. DT. Miller et al, Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. Am J Hum Genet, pp. 49–64, 2010.
4. Stavropoulos DJ, Shago M, Genomic microarray testing – CCMG guideline, 2016.
5. M. Stosic, B. Levy and R. Wapner, The Use of Chromosomal Microarray Analysis in Prenatal Diagnosis. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America, pp. 55–68, 2018.
6. [6] Manning M, Hudgins L, Professional P, Guidelines C, Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. Genet Med, pp. 2–5, 2010.
7. E. Karampetsov et al, Microarray Technology for the Diagnosis of Fetal Chromosomal Aberrations: Which Platform Should We Use? Journal of Clinical Medicine, pp. 663–678, 2014.
8. Committee on Genetics and the Society for Maternal-Fetal Medicine Committee Opinion: Microarrays and Next-Generations Sequencing Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic Tools in Obstetrics and Gynecology, Obstet Gynecol, 2016.
9. R.J. Wapner et al, Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. N Engl J Med, pp. 75–84, 2012.
10. De Wit MC, Srebniak MI, Govaerts LC, Van Opstal D, Galjaard RJ, Go AT. Additional value of prenatal genomic array testing in fetuses with isolated structural ultrasound abnormalities and a normal karyotype: a systematic review of the literature, Ultrasound Obstet Gynecol, pp. 39–46, 2014.
11. LG. Shaffer et al, Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound, Prenat Diagn, pp. 86–95, 2012.
12. FA. Jansen et al, Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: a systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol, pp. 27–35, 2015.
13. Jingjing Xian et al, Clinical Utility of SNP Array Analysis in Prenatal Diagnosis: A Cohort Study of 5000 Pregnancies. Frontiers in Genetics, 2020.

Mời viết bài nội san Y học sinh sản tập 63

Hạn chót nhận bài cho tập 63 là 30 . 5 . 2022



UNG THƯ & BẢO TỒN SINH SẢN



Hướng dẫn viết bài
cho Y học sinh sản tập 63

