

ÁP DỤNG KỸ THUẬT QF-PCR TRONG CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH CÁC HỘI CHỨNG BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ THƯỜNG GẶP

Nguyễn Thúy Huyền; Triệu Tiến Sang*; Nguyễn Duy Bắc**

TÓM TẮT

Sử dụng bộ kit chẩn đoán trước sinh của hãng Aneufast với 29 cặp mồi huỳnh quang trong chẩn đoán trước sinh trên 60 mẫu dịch ối (50 mẫu bệnh và 10 mẫu chứng), kết quả như sau:

- Đã chuẩn hóa chu trình nhiệt và thành phần phản ứng multiplex PCR trong việc khuếch đại 29 cặp mồi huỳnh quang trên 5 nhiễm sắc thể (NST). Sau khi chuẩn hóa thành phần phản ứng PCR, thể tích phản ứng multiplex PCR là 7 μ l vẫn cho kết quả chính xác, giúp giảm hóa chất, giảm chi phí xét nghiệm.

- Kỹ thuật QF-PCR cho độ chính xác trong chẩn đoán trước sinh 5 hội chứng bất thường NST thường gặp, đạt 100% so với kỹ thuật phân tích NST.

Với những ưu điểm của kỹ thuật là nhanh, chính xác, giá thành thấp, nên triển khai, áp dụng kỹ thuật QF-PCR ở các cơ sở nghiên cứu cũng như các bệnh viện chuyên ngành sản khoa.

* Từ khóa: Hội chứng bất thường nhiễm sắc thể; QF-PCR; Chẩn đoán trước sinh.

APPLYING QF-PCR ASSAY IN PRENATAL DIAGNOSING SOME MAJOR NUMERICAL CHROMOSOME DISORDERS

SUMMARY

Using of Aneufast prenatal diagnostic kit with 29 fluorescent primer pairs in prenatal diagnosing on 60 amniotic fluid samples (50 samples and 10 controls), we had the following remarks:

- We optimized heat cycle and components of multiplex PCR with 29 fluorescence primer pairs on chromosome 5. After optimization, reaction volume was 7 μ l which reduced chemicals and reduced test cost.

- QF-PCR technique demonstrated 100% specificity and accuracy for diagnosing 5 syndromes of numerical chromosomal abnormalities compared to karyotype analysis.

With the advantages of the technique are fast, accurate, low cost, QF-PCR technique should be applied in the implementation of research institutes as well as specialized maternity hospitals.

** Key words: Numerical chromosomal abnormalities; QF-PCR; Prenatal diagnose.*

* Học viện Quân y

Phân biệt khoa học: TS. Trần Văn Khoa

ĐẶT VẤN ĐỀ

Các dị tật bẩm sinh để lại những hậu quả nặng nề, trẻ sinh với tỷ lệ tử vong rất cao hoặc nếu còn sống sẽ mang những dị tật nặng, trí tuệ kém phát triển, trở thành gánh nặng cho gia đình và xã hội. Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới, tỷ lệ dị tật bẩm sinh chiếm 1,73%. Ở Việt Nam, nhiều nghiên cứu cũng cho thấy tỷ lệ dị tật bẩm sinh là 2,4 - 3,6%. Rối loạn NST là nguyên nhân chính gây ra dị tật bẩm sinh. Một số hội chứng bất thường NST thường gặp như: hội chứng Down, hội chứng Patau, Edward và một số hội chứng khác như Klinefelter, Turner. Việc chẩn đoán sớm các bệnh di truyền ở thời kỳ phôi thai là cần thiết để có các biện pháp xử lý phù hợp.

Chẩn đoán xác định thai nhi bị rối loạn NST phải nhờ đến kỹ thuật lập bản đồ NST (Karyotype), điều này cần phải có các tế bào của thai. Kỹ thuật QF-PCR được gọi là phản ứng chuỗi polymer hóa huỳnh quang định lượng dùng để khuếch đại các STR. Đây là phương pháp xác định dị tật về gen và NST hiệu quả, nhanh chóng hơn so với các phương pháp khác. Với những ưu điểm vượt trội so với các kỹ thuật trước đây, kỹ thuật QF-PCR có độ đặc hiệu cao, thời gian trả kết quả cũng như giá thành thấp, nhân lực sử dụng và khả năng áp dụng với quy mô lớn, đáp ứng được nhu cầu chẩn đoán cao. Ở Việt Nam, một số trung tâm lớn đã triển khai kỹ thuật FISH trong chẩn đoán các hội chứng trisomy 13, 18, 21 và bất thường NST X, Y. Tuy nhiên, vẫn chưa có cơ sở nào triển khai nghiên cứu và ứng dụng kỹ thuật QF-PCR trong chẩn đoán trước sinh. Xuất phát từ yêu cầu đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài nhằm mục tiêu:

- Chuẩn hóa quy trình kỹ thuật multiplex PCR trên mẫu dịch ối sử dụng bộ kit chẩn đoán trước sinh của hãng Aneufast.

- Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật QF-PCR sử dụng bộ kit Aneufast trong chẩn đoán trước sinh các hội chứng này.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Mẫu dịch ối của phụ nữ mang thai mắc các hội chứng trisomy 13, 18, 21, Klinefelter (XXY), hội chứng Turner (X), được chẩn đoán xác định bằng kỹ thuật karyotype hay FISH, thu thập từ Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, Trường Đại học Y Hà Nội, Bệnh viện 103, số lượng 50 mẫu, lượng dịch ối lấy từ 2 - 5 ml. Mẫu chứng: những trường hợp mẫu dịch ối của phụ nữ mang thai bình thường, số lượng 10 ca.

** Hoá chất:*

- Kít tách chiết ADN của hãng Quiagen.
- Bộ kít chẩn đoán trước sinh với 29 cặp mồi (Aneufast).
- Hoá chất dùng cho điện di: buffer GA 1X, Polymer POP4, capillary 36 cm.

** Thiết bị máy móc:*

- Máy đọc trình tự tự động ABI 3130 XL (Applied biosystem).
- Máy định lượng ADN (Nano Drop-USA).
- Máy PCR ABI 9700 (Applied biosystem).

2. Phương pháp nghiên cứu.

- Tách chiết ADN sử dụng bộ kít Quiagen, các bước thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất.

- Định lượng nồng độ ADN: độ tinh sạch của dung dịch dựa vào tỷ số OD 260 nm/280 nm. Một dung dịch axit nucleic được coi là sạch khi tỷ số OD là 1,7 - 2,0.

- Kỹ thuật nhân gen PCR.

- Kỹ thuật điện di trên máy ABI 3130 XL.

+ Thành phần hoá chất: gel điện di (POP₄), Hidi, đệm điện di.

+ Quy trình:

Thành phần điện di như sau:

TÊN HOÁ CHẤT	THỂ TÍCH
Size standard	0,5 µl
HiDi	20 µl
Mẫu	1 µl

Chu trình nhiệt biến tính

Biến tính	95 ^o C	5 phút	1 chu kỳ
Giữ mẫu	4 ^o C	∞	1 chu kỳ

- Phân tích kết quả: đánh giá số lượng gen tại các locus dựa vào số lượng, tỷ lệ chiều cao của các peak sau điện di mao quản tự động.

Bảng 1: Đối chiếu tỷ lệ các peak.

TỶ LỆ PEAK STR	KẾT QUẢ
0,8 - 1,4 : 1	Bình thường
≤ 0,6 - ≥ 1,8 : 1	Trisomy
1,6 : 1 đối với các alen ≥ 20 bp	Bình thường

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Một số đặc điểm sinh học của nhóm đối tượng nghiên cứu.

Bảng 2: Đặc điểm tuổi thai và số lần mang thai.

ĐẶC ĐIỂM	MẪU CHỨNG	MẪU BỆNH
Tuổi	30,3 ± 5,4	33,5 ± 6,8
Tuổi thai (tuần)	16,4 ± 1,2	18,3 ± 1,3
Số lần mang thai	2,2 ± 1,1	2,8 ± 1,4
Tổng số mẫu	10	50

Tuổi mang thai trung bình của phụ nữ thuộc nhóm có chỉ định chọc ối cao, 2 trường hợp sinh con ở tuổi > 35 và với 4 lần sinh con. Tuổi thai được chỉ định can thiệp chọc ối bắt đầu từ tuần thứ 15. Với tuổi thai như vậy sẽ bảo đảm tỷ lệ sảy thai thấp, chọc hút dịch ối dễ dàng do buồng ối đủ rộng.

Bảng 3: Đặc điểm màng ối của thai phụ.

ĐẶC ĐIỂM	NHÓM CHỨNG		NHÓM BỆNH	
	n	%	n	%
Rau bám mặt trước	3	30	16	32,0
Rau bám mặt sau	6	60	27	54,0
Rau bám toàn bộ	1	10	7	14,0
Tổng	10	100	50	100

Tỷ lệ có rau bám mặt trước khá cao (> 32%), vị trí bám này ảnh hưởng đến việc xác định điểm chọc ối trên thành bụng và kỹ thuật loại bỏ lượng máu mẹ trong mẫu ối. Những ca có rau bám mặt sau là những ca thuận lợi cho thủ thuật chọc ối.

* *Tiền sử mang thai:* bình thường: 50 ca (83,3%); bất thường: 10 ca (16,7%). Số ca có dị tật nhưng tiền sử mang thai lần trước cũng như tiền sử gia đình bình thường khá cao. Điều này gợi ý, trong việc sàng lọc cũng như đánh giá yếu tố nguy sinh con dị tật bẩm sinh chính xác hơn.

2. Kết quả chuẩn hóa chu trình nhiệt phản ứng multiplex-PCR.

* Chuẩn hóa chu trình nhiệt phản ứng multiplex-PCR (bảng 4):

95°C	15 PHÚT	1 CHU KỲ
94°C	40 giây	28 chu kỳ
60°C	1 phút 30 giây	
72°C	40 giây	
60°C	30 phút	1 chu kỳ
4 - 25°C	∞	1 chu kỳ

Sau khi phản ứng PCR hoàn thành, có thể giữ mẫu với thời gian dưới 2 tuần ở nhiệt độ 2°C - 6°C hoặc thời gian trên 2 tuần ở nhiệt độ -4°C đến -20°C, tránh ánh sáng.

* Kết quả chuẩn hóa thành phần phản ứng PCR:

Việc chuẩn hóa thành phần phản ứng PCR được tiến hành qua các giai đoạn sau (bảng 5):

THÀNH PHẦN	GIAI ĐOẠN 1	GIAI ĐOẠN 2	GIAI ĐOẠN 3	GIAI ĐOẠN 4
PCR reaction mix	15 µl	13 µl	5 µl	5 µl
Mẫu (nồng độ mẫu đưa vào phản ứng PCR)	1 µl	0,5 µl	1 µl	1 µl
Nước	9 µl	1,5 µl	4 µl	1 µl
Tổng	25 µl	15 µl	10 µl	7 µl

Từ thể tích 25 µl, 15 µl, 10µl, 7 µl chúng tôi lựa chọn thể tích phản ứng là 7 µl. Vì với những thể tích trên cho mỗi phản ứng đều thu được kết quả như nhau. Giảm thể tích phản ứng cũng là giảm chi phí cho BN.

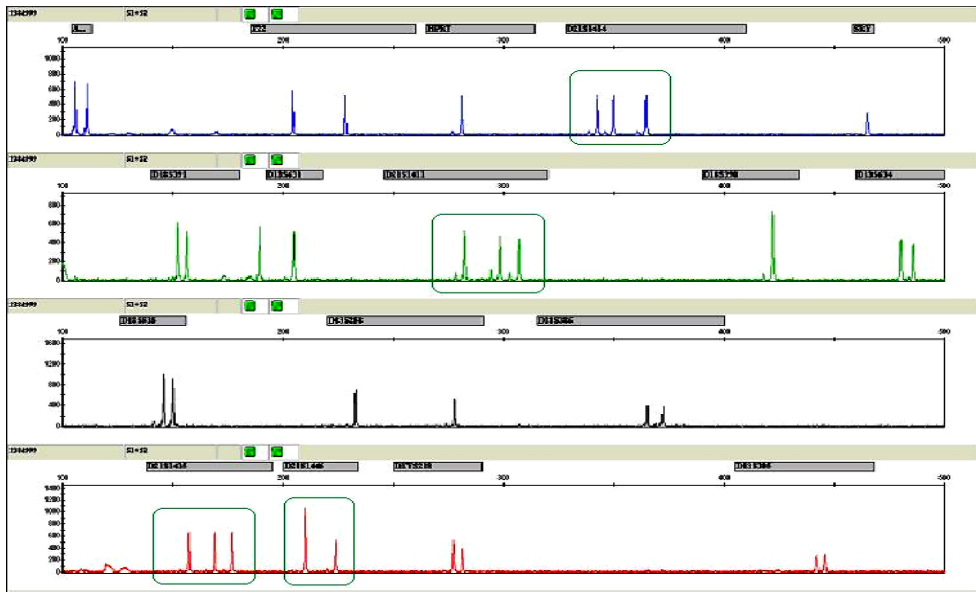
3. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật.

Bảng 6: Kết quả chẩn đoán dị tật thai nhi.

ĐẶC ĐIỂM	SỐ MẪU		Tỷ Lệ (%)	ĐỘ CHÍNH XÁC (%)
	Karyotype	QF-PCR		
Trisomy 21	25	25	49,0	100
Trisomy 18	15	15	29,4	100
Trisomy 13	5	5	9,81	100
45, X	3	3	5,91	100
XXY	1	1	1,96	100
Tam bội	1	1	1,96	100
Bình thường (1 trường hợp)	46, XY	46, XX	1,96	100
Tổng	50	50	100	100

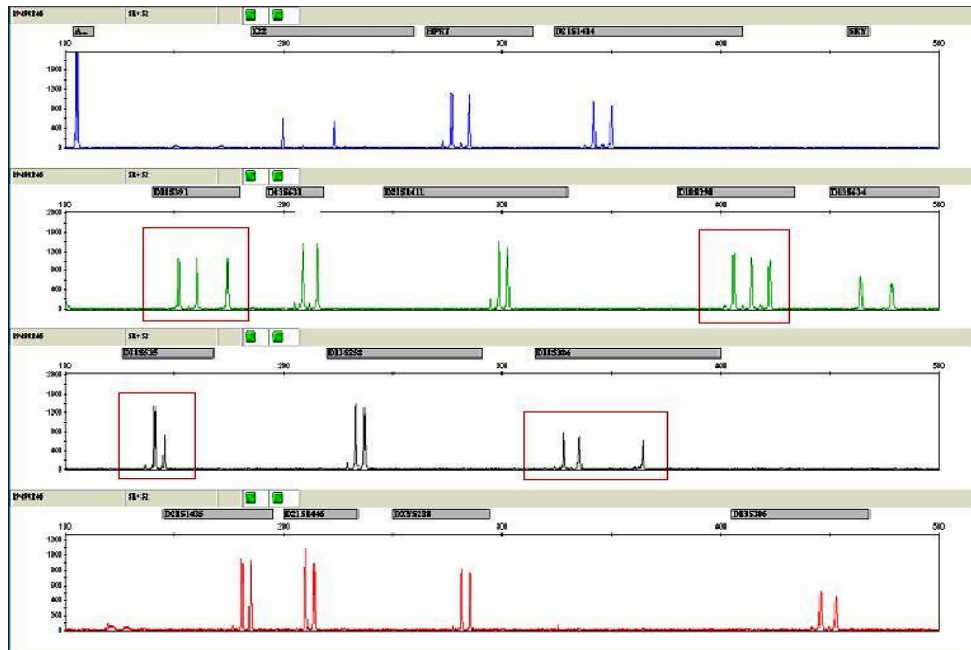
Tổng số mẫu nghiên cứu 60, số mẫu mắc hội chứng trisomy 21 chiếm tỷ lệ cao nhất (49%), sau đến trisomy 18 (29,4%), trisomy 13 (9,810%). Một số ca hiếm gặp như XXY, tam bội, 45,X. Kết quả này cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây. Đặc biệt, 1 trường hợp, kỹ thuật QF-PCR chẩn đoán là 46, XX bình thường, nhưng kỹ thuật Karotype lại là 46, XY bình thường. Kiểm chứng lại kết quả bằng nhân gen SRY trên NST Y cho thấy kỹ thuật QF-PCR cho kết quả chính xác. Điều này là do NST X bị đứt vai ngắn nên kỹ thuật Karotype cho kết quả là NST Y.

Kết quả của kỹ thuật QF-PCR trùng khớp 100% so với kết quả phân tích NST (Karyotype). Từ đó, cho phép có thể sử dụng kỹ thuật QF-PCR vào chẩn đoán trước sinh các hội chứng bất thường NST.



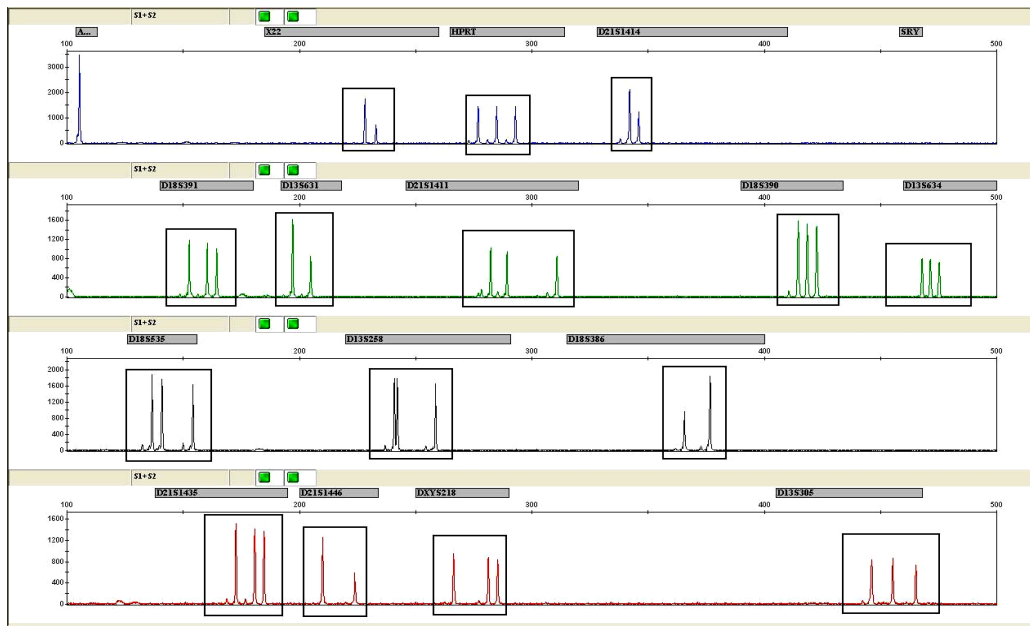
Hình 1: Kết quả điện di mao quản mẫu mắc hội chứng Down (trisomy 21).

Ở locus D21S1434, D21S1411, D21S1435 có 3 peak với tỷ lệ 1:1:1; locus D21S1406 có 2 peak với tỷ lệ 2:1.



Hình 2: Kết quả điện di mao quản mẫu mắc hội chứng Edwards (trisomy 18).

Ở locus D18S391, D18S333 và D18S336 có 3 peak với tỷ lệ 1:1:1; locus D18S638 có 2 peak với tỷ lệ 2:1.



Hình 3: Kết quả điện di mao quản mẫu mắc hội chứng tam bội của BN Nguyễn Thị H. Kết quả cho thấy các NST đều có 3 peak, 3 NST thay vì 2 NST ở mỗi cặp tương đồng.



Hình 4: Kết quả Karotype của trường hợp Nguyễn Thị H. mang thai mắc hội chứng tam bội.

KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu trên 60 mẫu dịch ối, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Đã chuẩn hóa chu trình nhiệt và thành phần phản ứng multiplex PCR trong việc khuếch đại 29 cặp mồi huỳnh quang trên 5 NST. Sau khi chuẩn hóa thành phần phản ứng PCR, lựa chọn thể tích phản ứng là 7 μ l cho 1 phản ứng vẫn cho kết quả chính xác, giảm hóa chất, giảm chi phí xét nghiệm.

2. Đã đánh giá được độ chính xác của kỹ thuật QF-PCR so với kỹ thuật phân tích NST: kỹ thuật QF-PCR cho độ chính xác 100% trong chẩn đoán trước sinh 5 hội chứng bất thường NST thường gặp.

3. Đây là công trình đi tiên phong trong áp dụng kỹ thuật QF-PCR vào chẩn đoán trước sinh ở Việt Nam. Kỹ thuật với nhiều ưu điểm: thời gian của một xét nghiệm khoảng 4 giờ sau khi lấy mẫu, giá thành xét nghiệm thấp hơn nhiều lần so với phương pháp truyền thống.

KIẾN NGHỊ

Với những ưu điểm trên, nên triển khai, áp dụng kỹ thuật QF-PCR ở các cơ sở nghiên cứu cũng như các bệnh viện, góp phần chẩn đoán trước sinh sớm, chính xác, nhanh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Lương Thị Lan Anh*. Nghiên cứu tần suất và bất thường NST của hội chứng NST X dễ gãy tại một số vùng dân cư. Luận văn Thạc sỹ Y học. Trường Đại học Y Hà Nội. 2003.

2. Nhận xét về tình hình chọc hút nước ối trong chẩn đoán trước sinh tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội. tạp chí Y học thực hành. 2009, số 3.

3. *Fernández-Martínez FJ, Gallindo A, Moreno Izquierdo A, et al*. Application of QF-PCR for the prenatal assessment of discordant monozygotic twins for fetal sex. *Prenat Diagn*, 2007, 27, pp.648-652.

4. *Winfried Schmidt, Jutta Jenderny, Kurt Hecher, et al*. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy for chromosomes 21, 18, 13, and X by quantitative fluorescence polymerase chain reaction. *Fetal Diagn Ther*. 2006, 21 (4), pp.326-31. PMID: 16757905 [PubMed - indexed for MEDLINE].

5. *Haissam Rahil1, Jérôme Solassol, Christophe Philippe, et al*. Rapid detection of common autosomal aneuploidies by quantitative fluorescent PCR on uncultured amniocytes. *Eur J Hum Genet*. 2002, Aug,10 (8), pp.46246-6. PMID: 12111640 [PubMed - indexed for MEDLINE].

6. *Moon-Hee Lee, Hyun-Mee Ryu, Do-Jin Kim, Bom-Yi Lee, Eun-Hee Cho, et al*, Rapid prenatal diagnosis of down syndrome using quantitative fluorescent PCR in uncultured amniocytes. *Eur J Hum Genet*. 2002, Aug,10 (8), pp.462-466. PMID: 12111640 [PubMed - indexed for MEDLINE].

7. *Lothar Kochhan, Karsten R. Held, et al*. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol Hum Reprod*. 2000, Sep, 6 (9), pp.855-860. PMID: 10956559 [PubMed - indexed for MEDLINE].

8. *Radek Vodicka1, Radek Vrtel1, Ladislav Dusek, et al*. Refined fluorescent STR quantification of cell-free fetal DNA during pregnancy in physiological and Down syndrome fetuses. *Prenatal Diagnosis*.