

GIÁ TRỊ CỦA DNA THAI TỰ DO TRONG SÀNG LỌC TRƯỚC SINH KHÔNG XÂM LẤN PHÁT HIỆN LỆCH BỘI NHIỆM SẮC THỂ THAI SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ GIẢI TRÌNH TỰ BÁN DẪN DỰA VÀO PHƯƠNG PHÁP SEQFF

Hoàng Hải Yến^(1,2), Nguyễn Duy Ánh^(1,2), Nguyễn Minh Hiền⁽³⁾, Tạ Thành Văn⁽²⁾
(1) Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, (2) Trường Đại Học Y Hà Nội, (3) Bệnh viện Thanh Nhàn

DOI 10.46755/vjog.2019.4.561

Từ khóa: DNA thai tự do, sàng lọc trước sinh không xâm lấn, trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13, lệch bội NST giới tính.
Keywords: Cell free fetal DNA, non-invasive prenatal screening, trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13, sex chromosome aneuploidy.

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định giá trị của DNA thai tự do (cell-free fetal DNA-cffDNA) trong sàng lọc trước sinh không xâm lấn (Non-Invasive Prenatal Screening-NIPS) phát hiện lệch bội nhiễm sắc thể (NST) 21, 18, 13 và nhiễm sắc thể giới tính thai sử dụng công nghệ giải trình tự bán dẫn dựa vào phương pháp SeqFF.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thực hiện trên 1231 mẫu máu thai phụ mang thai đơn, có tuổi thai từ 10 tuần thai thuộc nhóm nguy cơ cao mang thai lệch bội nhiễm sắc thể. DNA tự do trong huyết tương mẹ được giải trình tự đồng thời, số lượng lớn các đoạn ngắn nucleotid (massive parallel sequencing-MPS) và phân tích bằng thuật toán tin sinh.

Kết quả nghiên cứu: cffDNA cao hơn có ý nghĩa thống kê giữa nhóm NIPS dương tính với trisomy 21 và 18 (12,55% và 10,55%) so với nhóm NIPS âm tính (7,5%). Có mối tương quan thuận có ý nghĩa giữa hệ số z-score và tỷ lệ cffDNA nhóm NIPS dương tính với trisomy 21, 18, 13 ($p < 0,05$). Giá trị tiên đoán dương cho các loại lệch bội NST 21, 18, 13 và NST giới tính lần lượt là 100%, 87%, 40%, 67%. Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương, giá trị tiên đoán âm cho các loại lệch bội của NST lần lượt là 100%; 99,3%; 86% và 100%.

Kết luận: Xét nghiệm sàng lọc trước sinh không xâm lấn phân tích cffDNA từ huyết tương mẹ, sử dụng công nghệ giải trình tự bán dẫn dựa vào phương pháp SeqFF là xét nghiệm sàng lọc với độ nhạy và độ đặc hiệu cao phát hiện trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính thai nhi trên nhóm thai phụ có nguy cơ cao mang thai lệch bội NST.

Từ khóa: DNA thai tự do, sàng lọc trước sinh không xâm lấn, trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13, lệch bội NST giới tính.

Abstract

VALUE OF CELL-FREE FETAL DNA FOR NON-INVASIVE PRENATAL SCREENING DETECTION

Tác giả liên hệ (Corresponding author):
Hoàng Hải Yến,
email: chuongnc2912@gmail.com
Ngày nhận bài (received): 03/05/2019
Ngày phản biện đánh giá bài báo (revised):
20/05/2019
Ngày bài báo được chấp nhận đăng
(accepted): 20/05/2019

OF FETAL ANEUPLOIDY USE SEMICONDUCTOR SEQUENCING TECHNOLOGY BASED ON THE SEQFF METHOD

Objective: Determine the value of cell-free fetal DNA (cffDNA) in non-invasive prenatal screening (NIPS) to detect chromosomal aneuploidy 21, 18, 13 and sex chromosomes use semiconductor sequencing technology based on the SeqFF method.

Material and Methods: The study carried out on 1231 blood samples of pregnancies with high risk for fetal aneuploidy and single gestation were enrolled at ≥ 10 weeks of gestation. Cell-free DNA were sequenced based on massively parallel sequencing and analyzed by bioinformatics algorithm. The z-score was calculated to determine aneuploidies, if the results were positive, then amniocentesis sampling was performed for conventional karyotype.

Results: The results showed that significantly higher cffDNA between positive NIPS group trisomy 21 and trisomy 18 (12.55% and 10.55%) compared to negative NIPS group (7.5%). There was a significant positive correlation between z-score and cffDNA group NIPS positive trisomy 13, 18, 21 ($p < 0.05$). Positive predictive values for the types of chromosomal biases 21, 18, 13 and sex chromosomes are 100%, 87%, 40%, 67%, respectively. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value for different types aneuploidy are 100%; 99.3%; 86% and 100% respectively.

Conclusion: the non-invasive prenatal screening of cffDNA from maternal plasma, using semiconductor sequencing technology based on the SeqFF method is a screening test with high sensitivity and specificity to detect trisomy 21, 18, 13 and sex chromosome aneuploidy has a high risk pregnancies.

Keywords: Cell free fetal DNA, non-invasive prenatal screening, trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13, sex chromosome aneuploidy

1. Đặt vấn đề

Việc phát hiện DNA thai tự do (cell-free fetal DNA - cffDNA) có nguồn gốc từ rau thai lưu hành trong máu mẹ năm 1997 [1] đã mở ra khả năng thực hiện xét nghiệm sàng lọc trước sinh không xâm lấn (Non-Invasive Prenatal Screening-NIPS) nhờ làm giảm nguy cơ mất thai do thủ thuật xâm lấn. Ứng dụng của cffDNA bao gồm phát hiện lệch bội NST thai, chẩn đoán bệnh di truyền đơn gen, xác định giới tính và xét nghiệm kiểu gen RhD của thai. Các nghiên cứu chủ yếu dựa trên phân tích định tính và định lượng cffDNA trong huyết tương mẹ. Từ 10-20 tuần thai, tỷ lệ cffDNA trong huyết tương mẹ từ 3-30%, trung bình là 10-15%. Hiện tại, ứng dụng phát hiện lệch bội NST thai bằng cffDNA chủ yếu dựa trên giải trình tự gen thế hệ mới (next generation sequencing-NGS) hay còn

gọi là MPS, giúp cho việc phát hiện cffDNA tốt hơn đáng kể so với các phương pháp PCR định lượng trước đó [2]. Việc xác định lệch bội thai dựa vào tỷ lệ tương đối của cfDNA có nguồn gốc từ mẹ và thai trong huyết tương mẹ so với chuẩn. Lượng cffDNA nhỏ nhất để cho được kết quả sàng lọc lệch bội NST chính xác phải đạt trên 3-4% [11]. Vì vậy, dù chỉ một lượng nhỏ DNA tự do trong huyết tương mẹ tăng lên cũng khiến cho tỷ lệ cffDNA thấp hơn 3-4%, đặc biệt trong trường hợp lượng cffDNA ban đầu thấp. Có một số yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ cffDNA như tuổi thai, cffDNA tăng theo tuổi thai. cffDNA cao ở thai phụ mang thai đôi, tiền sản giật, trisomy 21, cffDNA thấp trong trường hợp thai phụ có chỉ số khối cơ thể (body mass index-BMI) cao hay béo phì, tăng huyết áp, trisomies 13, trisomy 18, monosomy X và thể tam bội... Do vậy, xác định

tỷ lệ cfDNA trong huyết tương mẹ là vô cùng quan trọng trong phân tích kết quả NIPS. Có rất nhiều phương pháp xác định tỷ lệ cfDNA khác nhau như PCR định lượng DNA thai trong huyết tương của thai phụ mang thai nam. Phương pháp dựa vào sự khác biệt đa hình đơn nucleotide (single nucleotide polymorphism -SNP) giữa DNA tự do của mẹ và thai, vì vậy giá thành của xét nghiệm tăng lên rất cao. Phương pháp dựa trên kích thước cfDNA, cfDNA thai ngắn hơn cfDNA mẹ, tuy nhiên phương pháp này đòi hỏi giải trình tự 2 chiều (paired-end sequencing) và có độ chính xác không cao. Phương pháp dựa trên sự khác biệt về đặc điểm methyl hóa giữa DNA thai và DNA mẹ, đòi hỏi xử lý các gốc CpG và giải trình tự toàn bộ bộ gen đã bisulfite gây tốn kém và không thể áp dụng cho xét nghiệm thường quy [3], trong nghiên cứu sử dụng phương pháp giải trình tự ngẫu nhiên một chiều (single-end random sequencing) dựa vào đếm số lượng đoạn đọc trong mỗi vùng NST (SeqFF), quan trọng hơn, phương pháp SeqFF áp dụng cho cả thai phụ mang thai nữ.

Với sự phát triển của giải trình tự gen thế hệ mới, NIPS sử dụng giải trình tự đồng thời và số lượng lớn các đoạn ngắn nucleotid nhằm sàng lọc lệch bội NST với độ nhạy và độ đặc hiệu cao đã được chứng minh trên rất nhiều thử nghiệm lâm sàng [4]. Các tổ chức sản phụ khoa, di truyền lớn trên thế giới như ACOG, ACMG... đều khuyến cáo xét nghiệm NIPS nên được chỉ định cho thai phụ có nguy cơ cao mang thai lệch bội NST [5].

Phần lớn sàng lọc trước sinh không xâm lấn đều dựa trên công nghệ giải trình tự tổng hợp (sequencing by synthesis - SBS) của Illumina. Trong thời gian gần đây, nhiều nghiên cứu đã chứng minh dựa trên công nghệ giải trình tự bán dẫn (semiconductor sequencing) có khả năng phát hiện bất thường NST thai trong huyết tương mẹ chỉ trong thời gian giải trình tự ngắn (2-5 giờ) so với các phương pháp hiện tại (01-10 ngày) mà vẫn đảm bảo độ chính xác cao. Xuất phát từ những lý do trên, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu:

Xác định giá trị của cfDNA trong sàng lọc trước sinh không xâm lấn phát hiện lệch bội NST 21, 18, 13 và NST giới tính thai sử dụng công nghệ giải trình tự bán dẫn dựa vào phương pháp SeqFF.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- **Mẫu nghiên cứu:** 1231 thai phụ đến khám và được chỉ định làm xét nghiệm NIPS tại Trung tâm sàng lọc, chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.

- **Tiêu chuẩn lựa chọn:** Thai phụ mang thai đơn có tuổi thai trên 10 tuần, có ít nhất một trong những tiêu chuẩn sau được chọn làm đối tượng nghiên cứu: tuổi mẹ ≥ 35 tuổi khi sinh; Kết quả sàng lọc sàng lọc huyết thanh mẹ (Combined test, Triple test) có nguy cơ cao $\geq 1/250$ mang thai mắc trisomy 21, 18, 13; Siêu âm thai nhận thấy có tăng nguy cơ lệch bội NST hoặc có tăng độ mờ da gáy $\geq 3\text{mm}$; Tiền sử mang thai trước có lệch bội NST, thai chết lưu, sẩy thai nhiều lần, tiền sử gia đình có người lệch bội NST; Thai phụ đồng ý tham gia nghiên cứu.

- **Tiêu chuẩn loại trừ:** Thai phụ mang thai có tuổi thai <10 tuần; Thai phụ đa thai hoặc hội chứng mất thai trong thai đôi; Thai phụ đã thực hiện phẫu thuật cấy ghép hoặc trị liệu sử dụng tế bào gốc; Thai phụ được truyền máu trong vòng 3 tháng; Thai phụ được cho trứng, mang thai hộ; Thai phụ có lệch bội NST, thai phụ được chẩn đoán là đang mắc bệnh ung thư; Thai phụ không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 5/2016 đến tháng 10/2018.

Địa điểm tiến hành: Trung tâm sàng lọc, chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội. Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội.

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang, theo dõi dọc. Kết hợp với đối chiếu thực tế (tình trạng của trẻ khi sinh ra ...).

2.3. Các quy trình tiến hành nghiên cứu

- **Quy trình:** 10ml máu toàn phần thai phụ được lấy vào ống máu chuyên dụng Cell-Free DNA BCT (Streck), sau đó tách huyết tương, tách chiết DNA tự do (cfDNA) sử dụng kit và máy tách chiết DNA tự động. cfDNA sẽ được tạo thư viện và chuẩn bị mẫu trên máy lon Chef (mẫu thư viện được làm giàu sẽ được tự động nạp vào chip giải trình tự lon PI V3) và giải trình tự trên máy lon Proton.

- **Phân tích kết quả:** Sử dụng thuật toán dựa trên phương pháp đếm SeqFF của YOUNGENE ứng dụng tích hợp trong phần mềm tin sinh học phân tích tự động để tính toán tỷ lệ cffDNA trên mỗi mẫu và hệ số z-score cho từng NST. Các mẫu có cffDNA < 3,5%, dữ liệu nhiễu cao ($\geq 3,5$), số lượng đoạn đọc thấp (< 2 triệu) sẽ không trả được kết quả do không đảm bảo độ chính xác của xét nghiệm.

+ Xét nghiệm NIPS dương tính với NST 13, 18, 21: z-score ≥ 3 (trisomy), z-score ≤ -6 (monosomy).

+ Xét nghiệm NIPS dương tính với NST giới tính khi z-score của NST X:

• Trường hợp thai phụ mang thai nam: z-score ≥ 3 (47,XXY), z-score ≤ -3 (47,XXY).

• Trường hợp thai phụ mang thai nữ: z-score ≥ 3 (47,XXX), z-score ≤ -3 (45,X)

- **Chẩn đoán xác định** đối với thai phụ có kết quả NIPS dương tính: Chọc hút dịch ối, nuôi cấy tế bào, lập karyotype nhằm phân tích bộ NST thai được thực hiện theo chuẩn băng G như là một tiêu chuẩn vàng để đối chứng với phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới.

- **Theo dõi thai** đối với thai phụ kết quả NIPS âm tính: Theo dõi thai cho đến khi sinh tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, trẻ sơ sinh sẽ được khám ngay sau sinh bởi bác sỹ sơ sinh và theo dõi tình trạng của trẻ sau sinh bằng điện thoại cho sản phụ và gia đình sau 1 tháng.

2.4. Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Epidata 3.1 để nhập số liệu, phần mềm STATA 14 (StataCorp - Texas 77845 USA) để phân tích số liệu. Sử dụng tương quan tuyến tính (Pearson) để tìm mối tương quan giữa 2 biến ngẫu nhiên liên tục. Sử dụng test ANOVA 1 chiều có hiệu chỉnh Bonferroni để tìm sự khác biệt giữa các giá trị trung bình của nhiều nhóm. Mức ý nghĩa thống kê được thiết lập khi $p < 0,05$.

2.5. Đạo đức trong nghiên cứu của đề tài

Nghiên cứu được thực hiện sau khi đề cương được Hội đồng Đạo đức của Bệnh viện Phụ sản Hà Nội thông qua. Các đối tượng tham gia nghiên cứu là hoàn toàn tự nguyện và có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia nghiên cứu. Các thông tin liên quan đến bệnh nhân được đảm bảo bí mật. Các kỹ thuật, thao tác liên quan đến bệnh nhân được bảo đảm đúng chuyên môn.

Bệnh nhân không phải trả tiền thực hiện xét nghiệm chẩn đoán chọc hút dịch ối phân tích bộ NST lập karyotype trong trường hợp kết quả sàng lọc NIPS dương tính. Đề tài nghiên cứu này được thực hiện hoàn toàn vì mục đích khoa học không vì mục đích nào khác.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Đặc điểm	Giá trị
Tuổi mẹ	
Tuổi mẹ trung bình (năm)	34,3 ± 5,7 (17,47)
<35 tuổi (n, %)	537 (43,6%)
≥35 tuổi (n, %)	694 (56,4%)
Tuổi thai	
Tuổi thai trung bình (tuần)	15,2 ± 3,1 (10-30)
10-13 tuần 6 ngày (n, %)	468 (38,02%)
14-20 tuần 6 ngày (n, %)	704 (57,19%)
≥21 tuần (n, %)	59 (4,79%)

Nghiên cứu tiến hành trên 1231 thai phụ có tuổi trung bình là 34,3 ± 5,7. Tuổi ≥ 35 chiếm tỷ lệ cao là 56,4%. Tuổi thai trung bình trung bình là 15,2 ± 3,1. Tuổi thai 10-20 tuần 6 ngày chiếm tỷ lệ cao 95,21%.

3.2. So sánh tỷ lệ cffDNA theo các giai đoạn tuổi thai

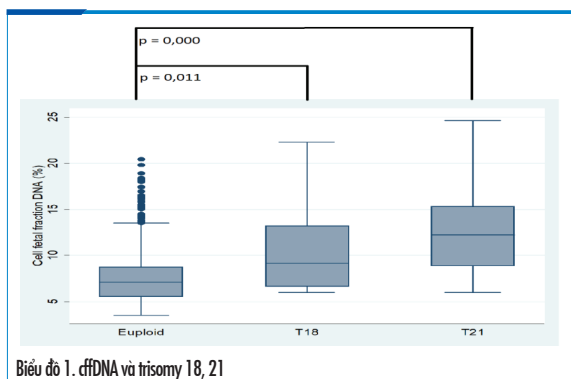
Bảng 2. So sánh tỷ lệ cffDNA và tuổi thai

Tuổi thai	cffDNA		$p^{1,2}$	$p^{1,3}$	$p^{2,3}$
	n	$\bar{x} \pm SD$			
10-13 tuần 6 ngày (1)	459	7,42 ± 2,80	1,000	0,000	0,000
14-20 tuần 6 ngày (2)	679	7,58 ± 2,65			
≥21 tuần (3)	42	9,60 ± 3,50			
Tổng	1180	7,59 ± 2,77			

Tỷ lệ cffDNA trong huyết tương mẹ ở tuổi thai từ 10-13 tuần 6 ngày và 14-20 tuần 6 ngày không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p^{1,2} = 1,000$). Tỷ lệ cffDNA ở tuổi thai từ 10-13 tuần 6 ngày, 14-20 tuần 6 ngày thấp hơn tuổi thai ≥ 21 tuần (Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p^{1,3} = 0,0$ và $p^{2,3} = 0,0$, tương ứng).

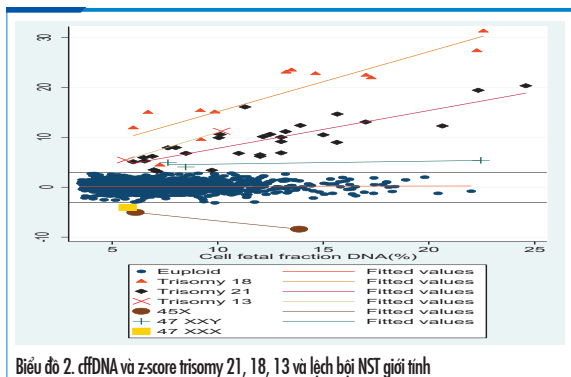
3.3. So sánh tỷ lệ cffDNA và trisomy 18, trisomy 21

Ở tuổi thai từ 10-20 tuần 6 ngày, tỷ lệ cffDNA ở nhóm NIPS dương tính trisomy 21 và trisomy 18 lần lượt là 12,55% và 10,55% cao hơn có ý nghĩa



thống kê so với nhóm NIPS âm tính là 7,5% với $p < 0,05$. Không tìm thấy sự khác biệt về tỷ lệ cffDNA giữa nhóm NIPS dương tính trisomy 21 và trisomy 18 với $p = 0,298 > 0,05$.

3.4. Tương quan giữa tỷ lệ cffDNA và z-score của trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính



Nghiên cứu phát hiện mối tương quan thuận có ý nghĩa giữa tỷ lệ cffDNA và z-score trong nhóm NIPS dương tính với trisomy 21, 18, 13 với $p < 0,001$. Mối tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ cffDNA và z-score trường hợp NIPS dương tính hội chứng Turner (45,X) với $p < 0,001$. Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ cffDNA và z-score trường hợp NIPS dương tính hội chứng Klinefelter (47,XXY) với $p > 0,05$. Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ cffDNA và z-score trường hợp NIPS âm tính NST 13, 18, 21, NST giới tính với $p > 0,05$.

3.5. Kết quả chẩn đoán trong trường hợp NIPS dương tính

Nghiên cứu phát hiện 59 thai phụ có kết quả NIPS dương tính, trong đó lần lượt có 30, 15, 05, 09 trường hợp trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính (04 hội chứng Turner, 03 hội chứng

Bảng 3. Kết quả chẩn đoán trong trường hợp NIPS dương tính

Lệch bội	Số lượng					Tỷ lệ mắc (%)
	NIPS (+)	TP	FP	TN	FN	
Trisomy 21	30	30	0	1201	0	2,44
Trisomy 18	15	13	2	1216	0	1,05
Trisomy 13	5	2	3	1226	0	0,16
SCA	9	6	3	1222	0	0,49
Tổng	59	51	8	1172	0	4,14

Ghi chú: SCA (Sex Chromosome Aneuploidy); lệch bội NST giới tính; TP: dương tính thật; FP: dương tính giả; TN: âm tính thật; FN: Âm tính giả

Klinefelter, 01 trường hợp 47,XXY và 01 trường hợp 47,XXX). Sau khi làm xét nghiệm chẩn đoán xác định phát hiện lần lượt có 02, 03, 03 trường hợp kết quả NIPS dương tính giả với trisomy 18, 13, lệch bội NST giới tính. Không phát hiện trường hợp nào có kết quả NIPS âm tính giả với lệch bội NST 21, 18, 13 và NST giới tính. Tỷ lệ mắc trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính lần lượt là 2,44%; 1,05%; 0,16%; 0,49%, tỷ lệ mắc lệch bội NST 21, 18, 13 và NST giới tính chung là 4,14%.

3.6. Giá trị của xét nghiệm NIPS

Bảng 4: Độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm NIPS

Lệch bội	Tỷ lệ % (95% CI)			
	Độ nhạy	Độ đặc hiệu	PPV	NPV
Trisomy 21	100 (88-100)	100 (100-100)	100 (88-100)	100 (100-100)
Trisomy 18	100 (75-100)	99,8 (99-100)	87 (60-98)	100 (100-100)
Trisomy 13	100 (16-100)	99,8 (99-100)	40 (5-85)	100 (100-100)
SCA	100 (54-100)	99,8 (99-100)	67 (30-93)	100 (100-100)
Tổng	100 (93-100)	99,3 (99-100)	86 (75-94)	100 (100-100)

Ghi chú: PPV: Giá trị tiên đoán dương; NPV: giá trị tiên đoán âm.

Độ nhạy, độ đặc hiệu cho các loại lệch bội NST 21, 18, 13 và NST giới tính lần lượt là 100% và 99,3%. Giá trị tiên đoán dương tính lần lượt là 100%, 87%, 40%, 67% cho NST 21, 18, 13, lệch bội NST giới tính. Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương, giá trị tiên đoán âm cho các loại lệch bội 21, 18, 13, lệch bội NST giới tính lần lượt là 100%, 99,3%, 86% và 100%.

4. Bàn luận

cffDNA trong huyết tương mẹ được giải phóng khỏi tế bào lá nuôi phôi do quá trình chết theo chương trình của tế bào trong quá trình phát triển liên tục của rau thai hoặc do các bệnh lý thai.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh cffDNA duy trì ổn định trước 21 tuần và tăng nhanh theo tuổi thai nhất là tuổi thai từ sau 21 tuần [2]. Trong nghiên cứu của chúng tôi trên 1231 thai phụ, 95,21% mẫu có tuổi thai dưới 21 tuần, không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa tỷ lệ cffDNA và tuổi thai trong nhóm này. Nghiên cứu nhận thấy tỷ lệ cffDNA ở tuổi thai 10-13 tuần 6 ngày và 14-20 tuần 6 ngày thấp hơn tuổi thai trên 21 tuần. Kết quả này cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu [6],[7].

Trong phân tích kết quả xét nghiệm sàng lọc trước sinh không xâm lấn phát hiện lệch bội NST thai thì tỷ lệ cffDNA đóng vai trò đặc biệt quan trọng, sự khác biệt cffDNA ở từng loại lệch bội NST có thể ảnh hưởng tới độ chính xác của xét nghiệm. Thai mắc trisomy 13, 18, monosomy X và thai tam bội có tỷ lệ cfDNA thấp hơn so với thai bình thường, cffDNA tăng trong nhóm NIPS dương tính với trisomy 21 khi so sánh với nhóm NIPS âm tính. Tuy nhiên, không phải tất cả các nghiên cứu đều xác nhận điều này [8]. Tỷ lệ cffDNA thấp trong trisomy 18, 13 có thể do thể tích rau thai nhỏ và thai chậm phát triển trong buồng tử cung (IUGR). Một số bằng chứng chỉ ra stress oxy hóa dẫn đến tăng quá trình apoptosis của rau thai và do đó tăng giải phóng cffDNA và vòng tuần hoàn. Trisomy 21 được chứng minh làm tăng stress oxy hóa [6]. Trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy, cffDNA tuần thai 10-20 tuần 6 ngày ở nhóm NIPS âm tính thấp hơn nhóm dương tính với trisomy 21, 18, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Không tìm thấy sự khác biệt cffDNA giữa nhóm dương tính trisomy 21 và trisomy 18. Có thể do cỡ mẫu chưa đủ lớn để tìm ra mối tương quan của cffDNA giữa 2 nhóm này (trisomy 21 = 20, trisomy 18 = 7).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, ngưỡng của cffDNA phải ít nhất từ 3,5%, nếu cffDNA dưới 3,5% sẽ không thể có kết quả NIPS do không đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm. 1,36% thai phụ (17/1248) không trả được kết quả xét nghiệm do cffDNA thấp dưới 3,5%, kết quả này cũng phù hợp với phân tích tổng hợp của Gil và cộng sự năm 2015, cffDNA thấp được báo cáo từ 0,5-6,1% [9].

Các nghiên cứu sử dụng phương pháp đếm SeqFF đã đưa ra bằng chứng về ảnh hưởng của cffDNA với lệch bội NST. Khi các cfDNA được giống hàng và đếm, số lượng cfDNA của mẹ và thai được coi là tương đương nhau. Trong trường

hợp mẹ và thai có bộ NST bình thường được coi là có số lượng NST giống hệt nhau. Khi thai mắc trisomy, cfDNA của NST mắc trisomy sẽ cao hơn do số lượng đoạn đọc của NST đó tăng. Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi cffDNA tăng, z-score của các trường hợp âm tính với trisomy 21, 18, 13 vẫn duy trì ổn định, trong khi z-score của trisomy 21, 18, 13 tăng mạnh [10]. Trong trường hợp cffDNA dưới 3,5% sẽ không được phân tích và không trả được kết quả NIPS. Dương tính giả với NIPS thường hay gặp trên thai phụ có cffDNA thấp và z-score thấp. Trong nghiên cứu chúng tôi sử dụng ngưỡng z-score đối với các trường hợp trisomy 13, 18, 21 là $\geq 3,5\%$, với những mẫu $3 \leq z\text{-score} < 3,5$ kết luận là nguy cơ trung bình và sẽ được giải trình tự lại lần 2. Trong nghiên cứu, 2 mẫu dương tính giả với trisomy 18 có z-score là 3,53 và 3,76; 3 mẫu dương tính giả với trisomy 13 có z-score là 3,22; 3,5 và 3,67 tương ứng; Đặc biệt rất khó phát hiện trisomy trong trường hợp khám do sự đóng góp vào bộ NST thai chỉ chiếm 1 tỷ lệ nhất định, DNA của NST khám chiếm tỷ lệ tương đương với tỷ lệ khám. Kết quả nghiên cứu có 1 mẫu khám trisomy 21 có z-score là 3,48. Ngưỡng cut off với mẫu lệch bội giới tính nam là z-score ≤ -3 ; 01 mẫu NIPS dương tính giả với kiểu hình là 47,YYY có z-score là -4,08. Ngưỡng cut off với mẫu lệch bội monosomy X (45,X) là z-score ≤ -3 ; 02 mẫu dương tính giả với kiểu hình 45,X có z-score là -3,52 và -4,3. Như vậy có thể nhận thấy các mẫu NIPS dương tính giả trong nghiên cứu đều có z-score trong khoảng ở ngưỡng nguy cơ trung bình hoặc sát ngưỡng nguy cơ cao, phù hợp với nghiên cứu của Yuan và cộng sự cho thấy trong trường hợp $3 \leq z\text{-score} < 5$ của trisomy 21, 18, 13, có tới 15/18 trường hợp dương tính giả, giá trị tiên đoán dương là 16,67% [11]. Do vậy, với kết quả NIPS dương tính sử dụng phương pháp đếm, nhất là các trường hợp cffDNA thấp và z-score ở ngưỡng nguy cơ trung bình, để phát hiện trisomy hoặc khám nhất thiết phải chỉ định xét nghiệm chẩn đoán xác định bằng kỹ thuật xâm lấn (sinh thiết gai rau hoặc chọc hút dịch ối) phân tích bộ NST lập karyotype.

Trong những năm vừa qua, NIPS đã được chứng minh là xét nghiệm sàng lọc trước sinh hiệu quả phát hiện trisomy 21, 18 và 13, ngoài ra còn phát hiện lệch bội NST giới tính. Nghiên cứu của chúng tôi

không phát hiện trường hợp nào NIPS dương tính giả với trisomy 21, giá trị tiên đoán dương của trisomy 21 là 100%. Phát hiện 02 trường hợp NIPS dương tính giả với trisomy 18, 03 trường hợp với trisomy 13, giá trị tiên đoán dương của trisomy 18 và 13 là 87% và 40%. Phát hiện 03 trường hợp NIPS dương tính giả với lệch bội NST giới tính, trong đó có 2 trường hợp với hội chứng Turner (45,X) và 1 trường hợp với 47,YYY, giá trị tiên đoán dương của lệch bội NST giới tính là 67%. Như vậy, có thể thấy kết quả NIPS dựa vào tỷ lệ cfDNA có giá trị tiên đoán dương rất cao trong việc phát hiện trisomy 21, còn trong phát hiện trisomy 18, trisomy 13 và lệch bội NST giới tính có giá trị thấp hơn. Tỷ lệ mắc trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính tương đương với nhiều nghiên cứu khác [12].

5. Kết luận

Xét nghiệm sàng lọc không xâm lấn phân tích cfDNA từ huyết tương mẹ, sử dụng công nghệ giải trình tự bán dẫn dựa vào phương pháp SeqFF có độ nhạy và độ đặc hiệu đều trên 99% phát hiện lệch bội NST 21, 18, 13 và NST giới tính thai nhi trên đối tượng thai phụ có nguy cơ cao mang thai lệch bội NST.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn Ban giám đốc Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, Bộ môn Hóa sinh Trường Đại học Y Hà Nội, Trung tâm sàng lọc, chẩn đoán trước sinh & sơ sinh Bệnh viện Phụ sản Hà Nội và Công ty Cổ phần Thiết bị Sài Gòn đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, et al (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350, 485-87.
2. Hudecova I, Sahota D, Heung MM, et al (2014). Maternal plasma fetal DNA fractions in pregnancies with low and high risks for fetal chromosomal aneuploidies. *PLoS One*, 9(2), e88484.
3. Kim SK, Hannum G, Geis J, et al (2015). Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat Diagn*, 35, 810-5.
4. Jeon YJ, Zhou Y, Li Y, et al (2014). The feasibility study of non-invasive fetal trisomy 18 and 21 detection with semiconductor sequencing platform. *PLoS One*, 9(10), e110240.
5. Gregg AR, Gross SJ, Best RG, et al (2013). ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genet Med*, 15(5), 395-398.
6. Yi Zhou, Zhongyi Zhu, Ya Gao, et al, (2015). Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma, *Reproductive Sciences*, 22 (11), 1429-1435.
7. Matthew S. Hestand, Mark Bessem, Peter van Rijn, et al (2018). Fetal fraction evaluation in non-invasive prenatal screening (NIPS). *European*

Journal of Human Genetics

8. Suzumori N, Ebara T, Yamada T, et al (2016). Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy. *J Hum Genet*, 61(7), 647.
9. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH (2015). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45, 249-66.
10. Xu-PingXu, Hai-YanGan, et al (2016). A Method to Quantify Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma Using Next Generation Sequencing: Its Application in Non-Invasive Prenatal Chromosomal Aneuploidy Detection. *Plos one*, 11(1), e0146997.
11. Yuan Tian, Linlin Zhang, Weifang Tian, et al (2018). Analysis of the accuracy of Z-scores of noninvasive prenatal testing for fetal Trisomies 13, 18, and 21 that employs the ion proton semiconductor sequencing platform. *Molecular Cytogenetics*, 11, 49
12. Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, et al (2014). Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am J Obstet Gynecol*, 211(4), 365.e1-12