

**BỘ GIÁO DỤC & ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

BỘ Y TẾ



HOÀNG HẢI YẾN

**NGHIÊN CỨU GIÁ TRỊ CỦA
PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ GEN
THỂ HỆ MỚI PHÁT HIỆN LỆCH BỘI
NHIỄM SẮC THỂ THAI BẰNG DNA
THAI TỰ DO TRONG MÁU MẸ**

Chuyên ngành : Hóa sinh

Mã số : 62720112

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

Người hướng dẫn: GS.TS. TẠ THÀNH VĂN

PGS.TS. NGUYỄN DUY ÁNH

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường họp
tại Trường Đại học Y Hà Nội

Vào giờ..... ngày tháng năm 20....

Có thể tìm hiểu luận án tại

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Bất thường nhiễm sắc thể (NST) thai xảy ra khoảng 1/150 trẻ sinh sống, là một trong số những nguyên nhân hàng đầu gây nên tử vong và bệnh tật cho trẻ sơ sinh trên toàn thế giới. Chiếm khoảng 83% của những bất thường này là do trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính gây ra hội chứng Down, Edwards, Patau, Turner... .

Cho đến nay, trên thế giới vẫn chưa có biện pháp nào phòng ngừa tình trạng thai mắc các hội chứng do bất thường NST. Các phương pháp sàng lọc trước sinh không xâm lấn phát hiện bất thường NST bao gồm siêu âm hình thái và phân tích huyết thanh từ máu thai phụ trong thai kỳ 1 và thai kỳ 2. Tỷ lệ phát hiện lệch bội dao động từ 50 - 95% với tỷ lệ dương tính giả khoảng 5% tùy thuộc vào phương pháp sàng lọc được sử dụng. Để chẩn đoán xác định thì các thai phụ có nguy cơ cao sẽ được thực hiện các thủ thuật xâm lấn như lấy mẫu gai rau hoặc hút dịch ối để khảo sát số lượng NST bằng các kỹ thuật Karyotype, QF-PCR, FISH, MLPA và Prenatal BoBs. Tuy nhiên, các thủ thuật xâm lấn này có thể gây mất thai với tỷ lệ là 0,11% - 0,22%. Vì vậy, rất cần có những phương pháp sàng lọc mới với tỷ lệ dương tính giả thấp đồng thời tỷ lệ phát hiện cao hơn, thai phụ không cần chịu thủ thuật xâm lấn, tránh được nguy cơ ảnh hưởng đến thai phụ và thai nhi.

Sàng lọc trước sinh không xâm lấn bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới phân tích DNA thai tự do trong máu thai phụ, giúp sàng lọc sớm thai nhi trên nhiều phương diện khác nhau, điển hình như: xác định sớm giới tính thai giúp tiên lượng khả năng thai mắc các bệnh do NST liên kết với giới tính; nguy cơ mắc các bệnh di truyền của thai trong những gia đình có nguy cơ cao, khảo sát yếu tố RhesusD, xác định nguy cơ tiền sản giật, trong đó nổi bật là ứng dụng sàng lọc sớm lệch bội NST (xét nghiệm NIPS). Đây được xem là một bước tiến vượt bậc trong lĩnh vực sàng lọc trước sinh không xâm lấn, do việc lấy mẫu và phân tích DNA thai tự do không đòi hỏi tính can thiệp sâu, giảm thiểu nguy cơ cũng như các biến chứng trên thai phụ và thai nhi. Hơn nữa, xét nghiệm NIPS có tỷ lệ phát hiện lệch bội NST 21, 18, 13 trên 99% với tỷ lệ dương tính giả thấp dưới 1%.

2. Mục tiêu của đề tài

1. *Ứng dụng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới phát hiện lệch bội NST 21, 18, 13, X, Y bằng DNA thai tự do trong máu mẹ.*
2. *Xác định tỷ lệ lệch bội NST 21, 18, 13, X, Y và bước đầu đánh giá giá trị của phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới sử dụng DNA thai tự do trong máu mẹ.*

3. Địa điểm thực hiện đề tài

Đề tài thực hiện tại Trung tâm Sàng lọc, Chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội; Bộ môn Hóa sinh, Đại học Y Hà Nội.

4. Những đóng góp của luận án

- Đã ứng dụng được quy trình giải trình tự gen thế hệ mới trong sàng lọc trước sinh không xâm lấn xác định lệch bội nhiễm sắc thể 21, 18, 13, X, Y bằng phân tích DNA thai tự do trong huyết tương thai phụ. Đã xác định được độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương, giá trị tiên đoán âm của trisomy 21, 18, 13 và lệch bội nhiễm sắc thể giới tính thai nhi.

- Kết quả của nghiên cứu có giá trị ứng dụng trong thực hành lâm sàng cao, đặc biệt trên những thai phụ đã được xét nghiệm sàng lọc trước sinh truyền thống có nguy cơ cao mang thai lệch bội nhiễm sắc thể, giúp làm giảm số lượng thai phụ phải thực hiện thủ thuật xâm lấn không cần thiết, giảm thiểu nguy cơ cũng như các biến chứng trên thai phụ và thai nhi.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.

Nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn cao góp phần cung cấp một kỹ thuật sàng lọc trước sinh hiện đại ngang tầm quốc tế, cung cấp cho thầy thuốc lâm sàng thêm một phương pháp sàng lọc trước sinh không xâm lấn có độ chính xác cao, giảm tỷ lệ dương tính giả, có thể áp dụng cho thai phụ từ tuần thai sớm.

Đề tài có tính sáng tạo, tính mới và cập nhật, lần đầu tiên triển khai thành công kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới sàng lọc lệch bội NST thai tại Việt Nam.

6. Cấu trúc luận án

- Luận án được trình bày trong 131 trang (không kể tài liệu tham khảo và phụ lục). Luận án chia làm 7 phần: Đặt vấn đề 2 trang; Chương 1: Tổng quan tài liệu 37 trang; Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 16 trang; Chương 3: Kết quả nghiên cứu 34 trang; Chương 4: Bàn luận 39 trang; Kết luận 2 trang; Khuyến nghị 1 trang.

- Luận án gồm 33 bảng, 15 biểu đồ, 25 hình và 2 sơ đồ, có 191 tài liệu tham khảo, trong đó có 06 tài liệu tiếng Việt và 185 tài liệu tiếng Anh. Phụ lục gồm: các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu, phiếu thông tin bệnh nhân; danh sách bệnh nhân tham gia nghiên cứu.

Chương 1: TỔNG QUAN

1.1. Bất thường nhiễm sắc thể thai

1.1.1. Tần suất xuất hiện

Bất thường NST phổ biến nhất là trisomy 21, 18, 13 và bất thường NST giới tính gây hội chứng Down, Edwards, Patau, Turner, Klinefelter... Thống kê của Tổng cục dân số cho thấy, mỗi năm Việt Nam có khoảng gần 1,5 triệu trẻ em mới được sinh ra, trong đó tỷ lệ dị tật bẩm sinh chiếm khoảng 1,5 - 2,0% trẻ sinh sống. Đáng lưu ý là mỗi năm có khoảng 1.400 - 1.800 trẻ mắc trisomy 21, khoảng 200 - 250 trẻ mắc trisomy 18.

1.1.2. Hậu quả của bất thường nhiễm sắc thể

Bất thường NST ảnh hưởng đến ít nhất 7,5% tất cả các trường hợp thụ thai, chiếm 50% trường hợp sảy thai tự nhiên trong ba tháng đầu hoặc chết trước khi sinh. Tần suất bất thường NST thường gặp từ 1/150 - 1/200 trẻ sinh sống. Khoảng 3 - 4% tất cả các ca sinh sống có liên quan đến đa dị tật bẩm sinh, chậm phát triển tâm thần hoặc rối loạn di truyền, tỷ lệ tăng gấp đôi khi trẻ được 7 - 8 tuổi với các rối loạn di truyền xuất hiện chậm hoặc được chẩn đoán muộn hơn.

1.2. Tổng quan về một số xét nghiệm sàng lọc, chẩn đoán trước sinh phát hiện bất thường NST

1.2.1. Các xét nghiệm sàng lọc trước sinh truyền thống

- Tuổi thai phụ: Nguy cơ bất thường NST tăng theo tuổi thai phụ. Nhóm thai phụ ≥ 35 tuổi được xếp vào nhóm có nguy cơ cao. Hiện nay, khoảng 15% phụ nữ mang thai ≥ 35 tuổi và tỷ lệ phát hiện trisomy 21 là 50%.

- Siêu âm thai: Rất nhiều bất thường hình thái thai nhi có thể phát hiện được bằng siêu âm trong thai kỳ 1. Một số hình ảnh bất thường về hình thái của thai nhi có thể hướng đến một số hội chứng bất thường NST, trong đó độ mờ da gáy (Nuchal translucency - NT) là một chỉ tiêu quan trọng.

- Sàng lọc trước sinh bằng xét nghiệm hóa sinh từ huyết thanh thai phụ
Sàng lọc thai kỳ 1 (11 - 14 tuần)

Sàng lọc kết hợp thai kỳ 1 thực hiện từ 11 - 14 tuần thai, dựa trên tuổi thai, tiền sử mang thai lệch bội NST, độ mờ da gáy kết hợp định lượng F β -hCG và PAPP-A trong huyết thanh thai phụ, sau đó dựa vào thuật toán tính nguy cơ mắc trisomy 21, 18 và 13. Tỷ lệ phát hiện trisomy 21 là 90% với tỷ lệ dương tính giả là 5%.

Sàng lọc thai kỳ 2 (15 - 22 tuần)

Sàng lọc thai kỳ 2 thực hiện từ 15 - 22 tuần thai dựa trên tuổi thai phụ kết hợp định lượng hCG, AFP, uE3 và Inhibin A trong huyết thanh thai phụ, sau đó dựa vào thuật toán tính nguy cơ mắc trisomy 21, 18 và dị tật ống thần kinh.

1.2.2. Các phương pháp chẩn đoán trước sinh

- Các phương pháp lấy mẫu trong chẩn đoán trước sinh

Phương pháp lấy mẫu xâm lấn như hút dịch ối hoặc lấy mẫu gai rau ảnh hưởng trực tiếp đến thai và có thể gây tai biến cho thai phụ (mất thai, rỉ ối...).

Phương pháp lấy mẫu không xâm lấn giúp thai phụ tránh được nguy cơ mất thai. Mẫu máu thai phụ có thể sử dụng để phân tích tế bào thai hoặc phân tích DNA thai tự do.

- Các kỹ thuật di truyền áp dụng trong chẩn đoán trước sinh

Kỹ thuật phân tích bộ NST lập karyotype; Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH); Kỹ thuật định lượng huỳnh quang PCR (QF-PCR); Kỹ thuật lai so sánh bộ gen (array CGH); Kỹ thuật Prenatal BoBs (PN BoBs)

1.3. Tổng quan về DNA thai tự do trong máu thai phụ

1.3.1. Nguồn gốc và đặc điểm DNA thai tự do trong huyết tương

DNA thai tự do (cffDNA) là các phân mảnh DNA ngắn có nguồn gốc từ rau thai, cffDNA có thể phát hiện sớm từ 5 - 7 tuần thai, chiều dài trung bình khoảng 150 - 200 bp, chiếm tỷ lệ 10 - 20% nồng độ DNA tự do trong huyết tương, nồng độ cffDNA tăng theo tuổi thai. Thời gian bán hủy trung bình của cffDNA là 16,3 phút (4 - 30 phút), cffDNA không thể phát hiện sau sinh 2 giờ.

1.3.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến nồng độ cffDNA

Lo và cộng sự đã chứng minh rằng nồng độ cffDNA tương quan thuận với tuổi thai, tương quan nghịch với cân nặng và chỉ số khối cơ thể (BMI) thai phụ. Nồng độ cffDNA cao gấp 1,6 lần ở thai phụ mang thai đôi so với thai đơn, tăng huyết áp cũng có thể làm giảm nồng độ cffDNA. Nồng độ cffDNA tăng trong trisomy 21, giảm trong trisomy 18, 13, monosomy X và thể tam bội. Một số yếu tố như tuổi thai phụ, giới tính thai, độ mờ da gáy thai, thai phụ mắc tiểu đường, bệnh lý tuyến giáp, nhiễm virus viêm gan B (HBsAg) không ảnh hưởng đến nồng độ cffDNA.

1.3.3. Ứng dụng lâm sàng của cffDNA trong huyết tương thai phụ

Xác định giới tính thai và chẩn đoán bệnh di truyền đơn gen; Xác định nhóm máu RhD của thai; Dự đoán nguy cơ tiền sản giật; Xét nghiệm huyết thống; Sàng lọc lệch bội NST thai...

1.4. Giải trình tự gen thế hệ mới ứng dụng trong phân tích cffDNA

1.4.1. Nguyên lý giải trình tự thế hệ mới

Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới hoạt động dựa trên nguyên lý tổng hợp tương tự như giải trình tự DNA theo phương pháp Sanger, trong đó DNA polymerase tổng hợp chuỗi DNA bằng cách sử dụng dNTP gắn vào đầu 3' của chuỗi DNA đang tổng hợp theo nguyên tắc bổ sung. Tuy nhiên, đối với giải trình tự thế hệ mới, thay vì giải trình tự một đoạn đơn lẻ, kỹ thuật này cho phép giải trình tự với một lượng lớn các đoạn DNA khác nhau song song tại cùng một thời điểm, từ đó tiết kiệm thời gian và cho lượng dữ liệu đầu ra vô cùng lớn so với phương pháp Sanger cũ.

+ Nguyên lý giải trình tự Illumina sử dụng công nghệ đọc trình tự theo nguyên lý tổng hợp (Sequencing By Synthesis - SBS) kết hợp với việc sử dụng các nucleotide có gắn tín hiệu huỳnh quang và khóa dừng thuận nghịch để đọc và nhận biết trình tự một cách trực tiếp.

+ Nguyên lý giải trình tự Ion Torrent hay giải trình tự bán dẫn (Ion semiconductor sequencing): Xác định trình tự nucleotide trong DNA thông qua việc phát hiện tín hiệu điện do ion H⁺ được giải phóng ra trong quá trình tổng hợp DNA bằng các máy đo pH siêu nhỏ gắn vào chip cảm ứng bán dẫn.

1.4.2. Ứng dụng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới trong xét nghiệm NIPS

Hiện tại có ba phương pháp khác nhau để phân tích cfDNA đang được sử dụng như: giải trình tự song song số lượng lớn ngẫu nhiên toàn bộ gen (Massive Parallel Shotgun Sequencing - MPSS), giải trình tự chọn lọc hay mục tiêu các vùng gen quan tâm bằng MPS (Chromosome Selective Sequencing - CSS) và giải trình tự bằng phân tích kiểu gen dựa vào đa hình đơn nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism - SNP). Trong mỗi phương pháp phân tích, sử dụng các thuật toán tin sinh học và phương pháp thống kê khác nhau để tính toán nguy cơ lệch bội NST.

1.4.3. Các nghiên cứu ứng dụng phương pháp giải trình tự thế hệ mới trong phân tích cfDNA sàng lọc lệch bội NST trên thế giới

Fan và cộng sự (2008) lần đầu tiên đưa ra kỹ thuật đếm định lượng NST trong sàng lọc trước sinh phát hiện lệch bội NST thai từ mẫu máu thai phụ sử dụng kỹ thuật MPSS.

Từ năm 2011, nhiều tổ chức lớn về sản phụ khoa và di truyền trên thế giới đã khuyến cáo sử dụng xét nghiệm NIPS trong thai kỳ. Các khuyến cáo đều thống nhất nên sử dụng xét nghiệm NIPS trên đối tượng thai phụ có nguy cơ cao mang thai lệch bội NST. Để xác định độ chính xác của xét nghiệm NIPS, phân tích tổng hợp của Gil và cộng sự năm 2015 cho thấy tỷ lệ phát hiện của trisomy 21, 18, 13 và monosomy X lần lượt là 99,2%; 96,3%; 91,0%; 90,3% và tỷ lệ dương tính giả của trisomy 21, 18, 13 lần lượt là 0,09%; 0,13%; 0,13%; 0,23%. Trong nghiên cứu so sánh xét nghiệm NIPS so với xét nghiệm sàng lọc kết hợp thai kỳ 1 (CFTS) cho thấy xét nghiệm NIPS có tỷ lệ dương tính giả thấp hơn hẳn CFTS là 0,1% so với 4,5%. Nghiên cứu so sánh hiệu quả xét nghiệm NIPS với sàng lọc trước sinh truyền thống trên 100.000 thai phụ tại Bỉ, cho thấy xét nghiệm NIPS đã làm giảm 94,8% các thủ thuật xâm lấn không cần thiết, giảm 90,8% tỷ lệ mất thai liên quan đến thủ thuật xâm lấn và tăng 29,1% tỷ lệ phát hiện thai mắc trisomy.

1.4.4. Nghiên cứu về xét nghiệm NIPS tại Việt Nam

Tại Việt Nam, các nghiên cứu phân tích cfDNA trong sàng lọc và chẩn đoán trước sinh vẫn còn hạn chế. Năm 2010, Nguyễn Thanh Thúy và cộng sự dùng kỹ thuật PCR lồng phát hiện cfDNA từ huyết thanh mẹ và ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh. Năm 2014, Triệu Tiên Sang và cộng sự đã bước đầu xây dựng được quy trình tách DNA tự do, phát hiện cfDNA trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật PCR. Năm 2019, Nguyễn Thị Phương Lan và cộng sự sử dụng kỹ thuật Realtime PCR phát hiện cfDNA trong huyết tương thai phụ dự báo sớm tiền sản giật.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Thai phụ có nguy cơ cao mang thai lệch bội NST do sàng lọc bằng các xét nghiệm trước sinh truyền thống tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội từ năm 2016 đến năm 2019.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

Những thai phụ mang thai đơn từ 10 tuần thai được sàng lọc bằng các xét nghiệm trước sinh truyền thống có nguy cơ cao mang thai lệch bội NST, có ít nhất một trong những tiêu chuẩn sau được chọn làm đối tượng nghiên cứu:

- Tuổi thai phụ ≥ 35 tuổi khi sinh.
- Siêu âm thai nhận thấy có tăng nguy cơ lệch bội NST.
- Tiền sử mang thai trước có lệch bội NST, thai chết lưu, sảy thai nhiều lần. Tiền sử gia đình có người lệch bội NST.
- Xét nghiệm sàng lọc trước sinh có nguy cơ cao mang thai lệch bội (nguy cơ trisomy 21, 18, 13 $\geq 1/250$), bao gồm sàng lọc kết hợp thai kỳ 1 (CFTS) hoặc sàng lọc thai kỳ 2 (triple test).
- Thai phụ đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

Những thai phụ sau không được chọn làm đối tượng nghiên cứu:

- Thai phụ mang thai < 10 tuần.
- Thai phụ mang đa thai hoặc mất một thai trong thai đôi (Vanishing Twins).
- Thai phụ đã thực hiện phẫu thuật ghép tạng hoặc điều trị tế bào gốc.
- Thai phụ được truyền máu trong vòng 3 tháng.
- Thai phụ được cho trứng, thai phụ mang thai hộ.
- Thai phụ có lệch bội NST, thai phụ mắc bệnh ung thư ác tính.
- Thai phụ không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang, kết hợp với đối chiếu thực tế (tình trạng của trẻ khi sinh ra...) sau sinh 1 tháng.

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Dựa theo công thức tính cỡ mẫu dành cho các nghiên cứu chẩn đoán, cỡ mẫu của nghiên cứu là 1231 thai phụ đủ tiêu chuẩn và đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2.3. Phương tiện nghiên cứu

- Máy móc và dụng cụ

Máy tách chiết DNA tự động, máy quang phổ phân tích chuỗi DNA kép, máy phân tích DNA tự động, máy PCR, máy chuẩn bị và xử lý mẫu trên chip bán dẫn (Ion Chef) và máy giải trình tự gen sử dụng chip bán dẫn (Ion Proton), ống lấy mẫu Streck BCT.

- *Hóa chất*

Hóa chất tách DNA tự do, hóa chất phân tích kích thước và nồng độ DNA, hóa chất đo nồng độ DNA chuỗi kép, hóa chất tinh sạch DNA sử dụng từ tính, hóa chất chuẩn bị mẫu và nhân bản DNA, hóa chất gắn barcode DNA vào mẫu, hóa chất chuẩn bị mẫu trên chip bán dẫn, chip bán dẫn sử dụng cho quá trình giải trình tự.

2.2.4. Các quy trình tiến hành nghiên cứu

- *Quy trình:* 10ml máu toàn phần thai phụ được lấy vào ống máu chuyên dụng Streck BCT, sau đó tách huyết tương, tách chiết DNA tự do. DNA tự do sẽ được tạo thư viện DNA, kiểm tra chất lượng thư viện DNA, chuẩn bị thư viện DNA trên máy Ion Chef (mẫu thư viện DNA được làm giàu sẽ được tự động nạp vào chip giải trình tự Ion PI V3) và giải trình tự trên máy Ion 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 dữ liệu nhiễu cao $\geq 3,5$; số lượng đoạn đọc DNA thấp < 2 triệu là mẫu giải trình tự thất bại. Các mẫu có cffDNA $< 3,5\%$ sẽ không trả kết quả NIPS do không đảm bảo độ chính xác của xét nghiệm.

+ Xét nghiệm NIPS dương tính với trisomy 13, 18, 21, X: z-score ≥ 3 .

+ 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 (45,X).

- *Chẩn đoán xác định đối với thai phụ có kết quả NIPS dương tính:* Thủ thuật xâm lấn 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 bằng điện thoại cho sản phụ và gia đình sau 1 tháng.

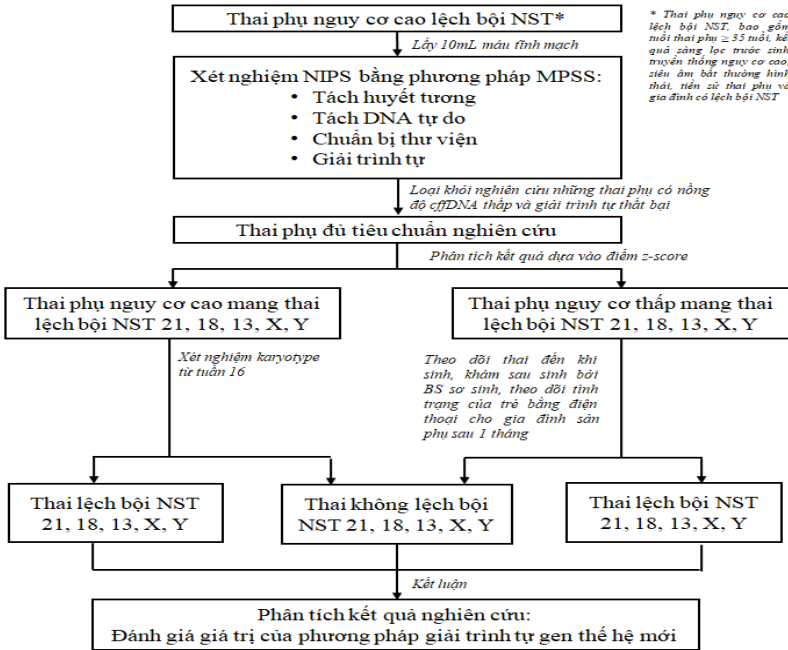
2.2.5. Xử lý số liệu

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 $p < 0,05$.

2.3. 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 theo quyết định số 09/PSHN - HĐĐĐ. Các đối tượng nghiên cứu cam kết đồng ý tham gia nghiên cứu, nhóm thai phụ kết quả NIPS dương tính được miễn phí thủ thuật xâm lấn và xét nghiệm karyotype, được bảo mật thông tin.

2.4. Sơ đồ nghiên cứu



* Thai phụ nguy cơ cao lệch bội NST, bao gồm tuổi thai phụ ≥ 35 tuổi, kết quả sàng lọc nước sinh nonyn thông nguy cơ cao, tiểu âm bất thường hình thái, tiền sử thai phụ và gia đình có lệch bội NST

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Ứng dụng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới phát hiện lệch bội NST 21, 18, 13, X, Y bằng DNA tự do trong máu thai phụ

3.1.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Bảng 3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Đặc điểm	Giá trị
Tuổi mẹ trung bình (năm)	$34,3 \pm 5,7$ (17-47)
Tuổi thai trung bình (tuần)	$15,2 \pm 3,1$ (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 $34,3 \pm 5,7$ tuổi. Tuổi thai trung bình trung bình là $15,2 \pm 3,1$ tuần. Tuổi thai từ 10 - 20 tuần 6 ngày chiếm tỷ lệ cao là 95,21%.

Bảng 3.2. Yếu tố nguy cơ của thai phụ làm xét nghiệm NIPS

Yếu tố nguy cơ	Số lượng		
	n	Tổng	%
Tuổi thai phụ ≥ 35 tuổi	694	1231	56,4
Siêu âm bất thường	123	1231	10,0
Sàng lọc HT nguy cơ cao	814	1231	66,1
Tiền sử	95	1231	7,7
> 1 yếu tố nguy cơ	467	1231	37,9

1231 thai phụ có các yếu tố nguy cơ được chỉ định làm xét nghiệm NIPS. Trong đó, sàng lọc bằng huyết thanh mẹ nguy cơ cao chiếm tỷ lệ cao nhất là 66,1%, tiếp theo là nhóm thai phụ tuổi ≥ 35 tuổi chiếm tỷ lệ 56,4%, thai phụ có kết quả siêu âm bất thường chiếm tỷ lệ 10%. Nhóm thai phụ có tiền sử sinh con bất thường NST hoặc sử dụng thuốc trước hay trong quá trình mang thai, tiền sử sảy thai, thai chết lưu nhiều lần, tiền sử gia đình có người lệch bội NST chiếm tỷ lệ thấp nhất là 7,7%.

3.1.2. Kết quả tách chiết DNA tự do và tạo thư viện DNA

Bảng 3.1. Nồng độ DNA tự do và nồng độ thư viện DNA

Nồng độ (ng/ μ L)	n	$\bar{X} \pm SD$	Min - Max	95% CI
DNA tự do	1231	4,37 \pm 1,17	2,24-11,7	4,36-4,38
DNA thư viện	1231	2,93 \pm 1,68	0,051-18,6	2,92-2,94

Nồng độ DNA tự do trung bình là $4,37 \pm 1,17$ ng/ μ L (95% CI: 4,36 - 4,38ng/ μ L) với dao động từ 2,24 - 11,7ng/ μ L. Nồng độ thư viện DNA tự do trung bình thu được sau bước chuẩn bị thư viện là $2,93 \pm 1,68$ ng/ μ L (95% CI: 2,92 - 2,94ng/ μ L) với dao động từ 0,051 - 18,6ng/ μ L.

3.1.2. Kết quả chất lượng giải trình tự



Hình 3.1. Hiệu quả nạp mẫu vào chip giải trình tự

Hình 3.1 minh họa kết quả giải trình tự trên 1 chip: DNA thư viện sau khi được gắn lên bề mặt hạt ISP (Ion Sphere Particle) sẽ được nhân bản và nạp vào chip giải trình tự.

Bảng 3.2. Kết quả chất lượng ISP trên chip giải trình tự

Kết quả giải trình tự	n (chip)	$\bar{X} \pm SD$	Min-Max	95% CI
Tổng số base (Gb)	115	13,3±6,9	7,4-15,6	12,1-14,9
Mật độ ISP nạp vào giếng (%)	115	88,5±4,8	72,0-94,0	88,0-89,8
ISP có trên 1 loại DNA (%)	115	31,0±3,3	26,0-50,0	30,4-31,7
Trình tự kém chất lượng (%)	115	12,8±8,5	3,0-48,0	10,4-13,6
ISP đạt chất lượng (%)	115	60,6±5,8	40,0-69,0	59,6-61,8
Số lượng giếng có hạt ISP (triệu)	115	78,9± 10,8	46,6-95,9	77,0-80,8

Kết quả giải trình tự trên hệ thống Ion Torrent sử dụng Ion PI Chip V3, cho thấy lượng dữ liệu thô sau giải trình tự dao động từ 7,4 - 15,6Gb, trung bình đạt được 13,3 ± 6,9Gb (95% CI, 12,1 - 14,9Gb). Mật độ hạt ISP nạp vào các giếng dao động từ 72,0 - 94,0%, trung bình đạt 88,5 ± 4,8% (95% CI, 88,0 - 89,8%). Kết quả chất lượng hạt ISP cho thấy xác suất hình thành hạt ISP có trên 1 loại DNA (polyclonal) là 31,0% và các trình tự kém chất lượng (low quality) là 12,8%. Hạt ISP đạt chất lượng chiếm tỷ lệ trung bình 60,6 ± 5,8%, dao động trong khoảng 40,0 - 69,0%, tương đương khoảng 78,9 ± 10,8 triệu giếng hay đoạn đọc DNA.

3.1.3. Tỷ lệ thất bại của xét nghiệm NIPS

Bảng 3.3. Tỷ lệ thất bại của của xét nghiệm NIPS

Nguyên nhân	Lần 1		Lần 2	
	n	%	n	%
Nồng độ cffDNA thấp	47/1249	3,76	17/1249	1,36
Dữ liệu nhiễu cao	4/1249	0,32	1/1249	0,08
Số lượng trình tự duy nhất thấp	4/1249	0,32	0/1249	0
Tổng	55/1249	4,4	18/1249	1,44

Tỷ lệ thất bại của xét nghiệm NIPS trong nghiên cứu là 1,44%, trong đó nồng độ cffDNA thấp chiếm 1,36% (47 mẫu lần 1 có nồng độ cffDNA dao động từ 0,85 - 3,44% đều được lấy mẫu lại lần 2, kết quả có 17 mẫu vẫn có nồng độ cffDNA thấp dao động từ 1,7 - 3,27%, 30 mẫu thành công có nồng độ cffDNA dao động từ 3,74 - 8,77%). Nguyên nhân giải trình tự thất bại do dữ liệu giải trình tự nhiễu cao sau giải trình tự lần 2 (dữ liệu nhiễu cao ≥ 3,5) chiếm tỷ lệ 0,08%.

3.1.4. Kết quả giải trình tự

Bảng 3.4. Kết quả giải trình tự

Đặc điểm	$\bar{X} \pm SD$ (n=1231)	Min - Max	95% CI
Nồng độ cffDNA (%)	7,79±3,04	3,51-24,59	7,62-7,96
URs (triệu)	4,4±1,1	2,0±17,7	4,3±4,5
DN (dữ liệu nhiễu)	0,38±1,09	(-2,31)-3,47	0,32-0,44

Sử dụng thuật toán SeqFF của Youngene Patent (Đài Loan) tính nồng độ cffDNA cho thấy nồng độ cffDNA trung bình trên 1 mẫu là 7,79 ±

3,04%, dao động trong khoảng 3,51 - 24,59% (95% CI, 7,62 - 7,96%). Số lượng trình tự duy nhất (URs) trên mỗi mẫu là $4,4 \pm 1,1$ triệu, dao động trong khoảng 2,0 - 17,7 triệu (95% CI, 4,34 - 4,46 triệu). Dữ liệu nhiễu giải trình tự (DN - Data Noise) trung bình mẫu là $0,38 \pm 1,09$, dao động trong khoảng từ -2,31 - 3,47 (95% CI, 0,32 - 0,44).

Bảng 3.5. Kết quả điểm z-score NST 21, 18, 13, X

z-score	NST 21	NST 18	NST 13	NST X
Không lệch bội (max)	2,57	2,8	2,77	2,9
Không lệch bội (min)	-4,59	-3,12	-3,99	-2,9
Lệch bội (max)	20,34	31,26	11,22	9,963
Lệch bội (min)	3,19	3,53	3,22	-8,41

Kết quả giải trình tự cho thấy có 59 mẫu lệch bội NST, điểm z-score trisomy 13 (n = 5) dao động từ 3,22 - 11,22. Điểm z-score trisomy 18 (n = 15) dao động từ 3,53 - 31,26. Điểm z-score trisomy 21 (n = 30) dao động từ 3,19 - 20,34. Điểm z-score của monosomy X (n = 4) dao động từ - 8,41 đến - 3,52, điểm z-score của 47,XXY (n = 3) dao động từ 4,05 đến 5,08, điểm z-score của 47,XYY là - 4,08(n=1), điểm z-score của 47,XXX là 9,963 (n = 1).

3.2. Xác định tỷ lệ lệch bội NST 21, 18, 13, X, Y và đánh giá giá trị của phương pháp giải trình tự gen thể hệ mới sử dụng DNA thai tự do trong huyết tương thai phụ

3.3.1. Tỷ lệ lệch bội NST sau giải trình tự

Bảng 3.6. Kết quả NIPS

Kết quả NIPS	Số lượng	
	n	%
Âm tính	1172	95,21
Dương tính	59	4,79
Tổng	1231	100

Giải trình tự 1231 mẫu máu thai phụ phát hiện 59 mẫu có kết quả NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 4,79%, 1172 mẫu có kết quả NIPS âm tính chiếm tỷ lệ 95,21%.

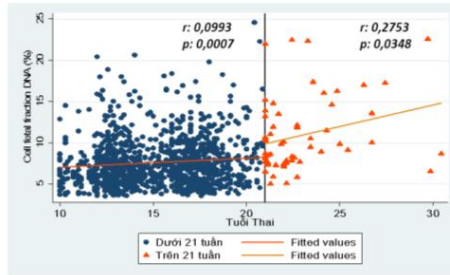
Bảng 3.7. Tỷ lệ lệch bội NST sau giải trình tự

Kết quả NIPS	Số lượng	
	n	%
Trisomy 21	30	50,8
Trisomy 18	15	25,4
Trisomy 13	5	8,5
Monosomy X	4	6,8
47,XXY	3	5,1
47,XYY	1	1,7
Trisomy X	1	1,7
Tổng số	59	100

59 mẫu NIPS dương tính có 30 mẫu dương tính với trisomy 21 chiếm tỷ lệ cao nhất là 50,8%; tiếp theo là 15 mẫu dương tính với trisomy 18 chiếm tỷ lệ 25,4%; 5 mẫu dương tính với trisomy 13 chiếm tỷ lệ 8,5%. Lệch bội NST giới tính chiếm tỷ lệ 15,3% (trong đó 6,8% mẫu dương tính với monosomy X; 5,1% mẫu dương tính với 47,XXY; 1,7% mẫu dương tính với 47,XYY và 1,7% mẫu dương tính với 47,XXX).

3.3.2. Giá trị nồng độ cffDNA trong xét nghiệm NIPS

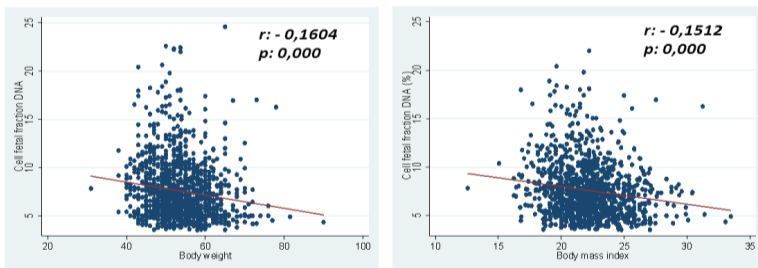
3.3.2.1. Nồng độ cffDNA và tuổi thai



Biểu đồ 3.1. Nồng độ cffDNA và tuổi thai

Nồng độ cffDNA tăng nhẹ ở nhóm thai phụ có tuổi thai từ 10 - 20 tuần 6 ngày, tìm thấy mối tương quan thuận có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và tuổi thai từ 10 - 20 tuần 6 ngày với $p = 0,0007$. Nhóm thai phụ có tuổi thai ≥ 21 tuần, nồng độ cffDNA tỷ lệ thuận với tuổi thai, nồng độ cffDNA tăng nhanh theo tuổi thai, tìm thấy mối tương quan thuận có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và tuổi thai ≥ 21 tuần với $p = 0,0348$.

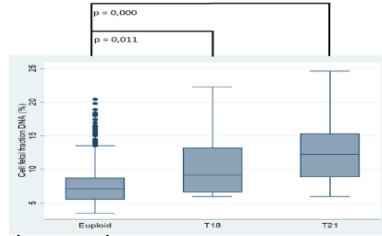
3.3.2.2. Nồng độ cffDNA và cân nặng, BMI thai phụ



Biểu đồ 3.2. Nồng độ cffDNA và cân nặng, BMI thai phụ

Nồng độ cffDNA tỷ lệ nghịch với cân nặng, BMI thai phụ, nồng độ cffDNA giảm khi BMI tăng, tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và cân nặng, BMI với $p = 0,000$.

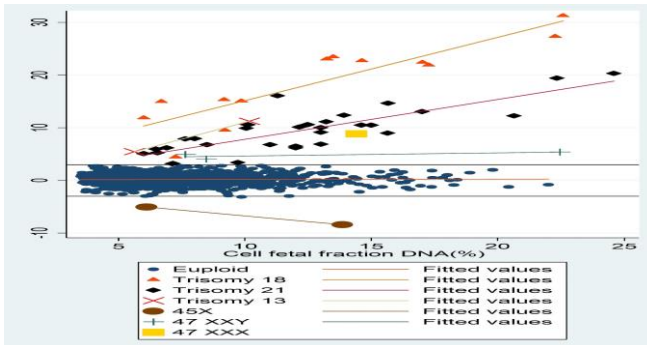
3.3.2.3. Nồng độ cffDNA và trisomy 21,18



Biểu đồ 3.3. Nồng độ cffDNA và trisomy 21, 18

20 mẫu có kết quả NIPS dương tính với trisomy 21 và 07 mẫu dương tính với trisomy 18 có tuổi thai từ 10 - 20 tuần 6 ngày, trong đó nồng độ 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 có nồng độ cffDNA là 7,5% ($p = 0,000$ và $p = 0,011$).

3.3.2.4. Nồng độ cffDNA và z-score của NST 21, 18, 13, X



Biểu đồ 3.4. Nồng độ cffDNA và z-score NST 21, 18, 13, X

Nghiên cứu phát hiện mối tương quan thuận có ý nghĩa giữa nồng độ cffDNA và z-score trong nhóm trisomy 21, 18, 13, $p < 0,001$. Phát hiện mối tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trường hợp monosomy X với $p < 0,001$. Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trường hợp 47,XXY, $p > 0,05$. Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trường hợp NIPS âm tính NST 13, 18, 21, X, $p > 0,05$.

3.3.3. Kết quả phân tích NST trên mẫu có kết quả NIPS dương tính

59 mẫu NIPS dương tính được chỉ định thủ thuật xâm lấn hút dịch ối, phân tích bộ NST bằng phương pháp di truyền tế bào, phân tích bộ NST lập

karyotype. Kết quả có 8 mẫu có kết quả bộ NST có số lượng và cấu trúc bình thường và 51 mẫu có kết quả lệch bội NST, trong đó: 29 mẫu trisomy 21 thuần và 01 mẫu trisomy 21 khảm (mos 47,XX,+21[8]/46,XX[72]); 12 mẫu trisomy 18 thuần và 01 mẫu chuyển đoạn không cân bằng giữa NST 18 và NST 21 tạo ra trisomy nhánh dài NST 18, [46,XX,der(21)t(18;21)(p11;q11)]; 02 mẫu trisomy 13 thuần, 01 mẫu monosomy X và 01 mẫu đột biến cấu trúc gây thiếu hụt các gen cần thiết trên nhánh dài NST X [46,X,i(Xq)]; 02 mẫu 47,XXY; 01 mẫu 47,XYY và 01 mẫu 47,XXX.

3.3.4. Giá trị của xét nghiệm NIPS trong sàng lọc lệch bội NST

Bảng 3.8. Giá trị xét nghiệm NIPS

NIPS (+)	Tỷ lệ % (95% CI)				Tỷ lệ mắc %
	Se	Sp	PPV	NPV	
T21, 18, 13	100,0 (92,1-100,0)	99,6 (99,0-99,9)	90,0 (78,2-96,7)	100,0 (100,0-100,0)	3,65
SCAs	83,3 (35,9-99,6)	99,8 (99,3-99,9)	62,5 (24,5-91,5)	99,9 (99,5-100,0)	0,41
Tổng	99,8 (89,6-100,0)	99,3 (98,7-99,7)	86,2 (74,6-93,9)	99,9 (99,5-100,0)	4,06

Ghi chú: Trisomy: T; Se: độ nhạy; Sp: độ đặc hiệu; PPV: Giá trị tiên đoán dương; NPV: giá trị tiên đoán âm; Lệch bội NST giới tính: SCAs.

Độ nhạy cho trisomy 21, 18, 13 và SCAs là 100,0% (95% CI: 92,1 - 100,0%) và 83,3% (95% CI: 35,9 - 99,6). Độ nhạy chung là 99,8% (95% CI: 89,6 - 100,0%). Độ đặc hiệu cho trisomy 21, 18, 13 là 99,6% (95% CI: 99,0 - 99,9%), lệch bội NST giới tính 99,8% (95% CI: 99,3 - 99,9%). Độ đặc hiệu chung là 99,3% (95% CI: 98,7 - 99,7%). Giá trị tiên đoán dương trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính là 90,0% (95% CI: 78,2 - 96,7%) và 62,5 % (95% CI: 24,5 - 91,5%). Giá trị tiên đoán dương chung là 86,2 % (95% CI: 74,6 - 93,9%). Giá trị tiên đoán âm trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính là 100,0% (95% CI: 100,0 - 100,0%) và 99,9 % (95% CI: 99,5 - 100,0%). Giá trị tiên đoán âm chung là 99,9% (95% CI: 99,5 - 100,0%). Tỷ lệ mắc trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính là 3,65% và 0,41%. Tỷ lệ mắc lệch bội chung là 4,06%.

Bảng 3.9. Kết quả NIPS dương tính với trisomy 21, 18, 13

NIPS (+)	Tỷ lệ % (95% CI)				Tỷ lệ mắc %
	Se	Sp	PPV	NPV	
T21	100 (88-100)	100 (100-100)	100 (88-100)	100 (100-100)	2,44
T18	100 (75-100)	99,8 (99-100)	87 (60-98)	100 (100-100)	1,05
T13	100 (16-100)	99,8 (99-100)	40 (5-85)	100 (100-100)	0,16
Tổng	100 (92,1-100)	99,6 (99-99,9)	90 (78,2-96,7)	100 (100-100)	3,65

Ghi chú: Trisomy: T; Se: độ nhạy; Sp: độ đặc hiệu; PPV: Giá trị tiên đoán dương; NPV: giá trị tiên đoán âm.

Kết quả xét nghiệm karyotype phát hiện 45 mẫu NIPS dương tính thật và 5 mẫu dương tính giả (2 mẫu trisomy 18 và 3 mẫu trisomy 13, kết quả xét nghiệm karyotype bình thường). Độ nhạy cho trisomy 21 là 100% (95% CI: 88 - 100%), trisomy 18 là 100% (95% CI: 75 - 100%), trisomy 13 là 100% (95% CI: 16 - 100%). Độ nhạy chung cho cả 3 loại trisomy là 100% (95% CI: 92,1 - 100%). Độ đặc hiệu cho trisomy 21 là 100% (95% CI: 100 - 100%), trisomy 18 và 13 đều là 99,8%. Độ đặc hiệu chung cho cả 3 loại trisomy là 99,6% (95% CI: 99 - 99,9%). Giá trị tiên đoán dương tính cao nhất là trisomy 21 chiếm 100% (95% CI: 88 - 100%), tiếp theo là trisomy 18 chiếm 87% (95% CI: 60 - 98%), thấp nhất là trisomy 13 chiếm 40% (95% CI: 5 - 85%). Giá trị tiên đoán dương cho cả 3 loại trisomy là 90% (95% CI: 78,2 - 96,7%). Giá trị tiên đoán âm cho cả 3 loại trisomy 21, 18, 13 là 100% (95% CI: 99,7 - 100%). Tỷ lệ mắc trisomy 21, 18, 13 lần lượt là 2,44%; 1,05%; 0,16%; tỷ lệ mắc trisomy 21, 18, 13 chung là 3,65%.

Bảng 3.10. Kết quả NIPS dương tính với lệch bội NST giới tính

NIPS (+)	Tỷ lệ % (95% CI)			
	Se	Sp	PPV	NPV
45,X	100,0 (15,8-100,0)	99,8 (99,4-100,0)	50,0 (6,76-93,2)	100,0 (99,7-100,0)
47,XXY	100,0 (15,8-100,0)	99,9 (99,5-100,0)	66,7 (9,43-99,2)	100,0 (99,7-100,0)
47,XYY	0,0 (0,0-97,5)	99,9 (99,5-100,0)	0,0 (0,0-97,5)	99,9 (99,5-100,0)
47,XXX	100,0 (2,5-100,0)	100,0 (99,7-100,0)	100,0 (2,5-100,0)	100,0 (99,7-100,0)
Tổng	83,3 (35,9-99,6)	99,8 (99,3-99,9)	62,5 (24,5-91,5)	99,9 (99,5-100)

Ghi chú: Se: độ nhạy; Sp: độ đặc hiệu; PPV: Giá trị tiên đoán dương; NPV: giá trị tiên đoán âm.

Kết quả xét nghiệm karyotype phát hiện 5 mẫu NIPS dương tính thật, 3 mẫu dương tính giả (2 mẫu dương tính giả với monosomy X và 1 mẫu dương tính giả với 47,XYY, kết quả karyotype bình thường) và 1 mẫu âm tính giả (1 mẫu dương tính với 47,XXY, kết quả karyotype là 47,XYY). Độ nhạy cho 45,X và 47,XXY là 100,0% (95% CI: 15,8 - 100,0%), 47,XYY là 0,0% (95% CI: 0,0 - 97,5%), 47,XXX là 100,0% (95% CI: 2,5 - 100,0%). Độ nhạy chung cho SCAs là 83,3% (95% CI: 35,9 - 99,6). Độ đặc hiệu cho 45,X là 99,8% (95% CI: 99,4 - 100,0%), 47,XXY và 47,XYY là 99,9% (95% CI: 99,5 - 100,0%), 47,XXX là 100,0% (95% CI: 99,7 - 100,0%). Độ đặc hiệu chung cho SCAs là 99,8% (95% CI: 99,3 - 99,9%). Giá trị tiên đoán dương 47,XYY thấp nhất chiếm 0,0% (95% CI: 0,0 - 97,5%), tiếp theo là 45,X chiếm 50% (95% CI: 6,76 - 93,2%), 47,XXY chiếm 66,7% (95% CI: 9,43 - 99,2%), cao nhất là 47,XXX chiếm 100% (95% CI: 2,5 - 100%). Giá trị tiên đoán dương cho SCAs là 62,5% (95% CI: 24,5 - 91,5%). Giá trị tiên đoán âm cho 45,X; 47,XXY; 47,XXX là 100,0% (95% CI: 99,7 - 100,0%) và 47,XYY là 99,9% (95% CI: 99,5 - 100,0%). Giá trị tiên đoán âm cho SCAs là 99,9% (95% CI: 99,5 - 100,0%).

3.3.5. Xét nghiệm NIPS dựa trên yếu tố nguy cơ

Bảng 3.11. Giá trị tiên đoán dương NIPS trên từng yếu tố nguy cơ

Đặc điểm	n, %	NIPS (+)	Karyotype		95% CI PPV%
			TP	FP	
Tuổi	694 (56,4%)	25 (3,6%)	20	05	80,0 (59,3-93,2)
SL HT	814 (66,1%)	16 (2%)	12	04	75,0 (47,6-92,7)
Siêu âm	123 (10%)	23 (18,7%)	22	01	95,7 (78,1-99,9)
≥ 1 YTNC	467 (37,9%)	23 (4,9%)	21	02	91,3 (72-98,9)

Ghi chú: SLHT: sàng lọc huyết thanh thai phụ; YTNC: Yếu tố nguy cơ; TP: dương tính thật; FP: dương tính giả; PPV: Giá trị tiên đoán dương

Kết quả NIPS dương tính do siêu âm hình thái bất thường chiếm tỷ lệ cao nhất là 18,7%, giá trị tiên đoán dương tính chiếm tỷ lệ cao nhất là 95,7%. Tiếp theo là kết quả NIPS dương tính do có trên 1 yếu tố nguy cơ chiếm tỷ lệ 4,9%, giá trị tiên đoán dương tính chiếm tỷ lệ 91,3%. Kết quả NIPS dương tính do tuổi thai phụ chiếm tỷ lệ thấp là 3,6%, giá trị tiên đoán dương tính do tuổi thai phụ chiếm tỷ lệ 80%. Kết quả NIPS dương tính do sàng lọc huyết thanh chiếm tỷ lệ thấp nhất 2%, giá trị tiên đoán dương tính do sàng lọc huyết thanh chiếm tỷ lệ thấp nhất là 75%.

3.3.7. Kết quả NIPS dương tính liên quan đến siêu âm bất thường

Bảng 3.12. NIPS dương tính liên quan đến độ mờ da gáy

NT (mm)	NIPS (n, %)		Tổng (n, %)	P (χ^2 test)
	Dương tính	Âm tính		
< 2	18 (2,5%)	710 (97,5%)	728 (100,0%)	0,000
2 - 2,9	04 (5,3%)	71 (94,7%)	75 (100,0%)	
3 - 3,9	05 (25,0%)	15 (75,0%)	20 (100,0%)	
4 - 5,8	04 (57,1%)	03 (42,9%)	07 (100,0%)	
Tổng	31 (3,7%)	799 (96,3%)	830 (100,0%)	

Ghi chú: NT: độ mờ da gáy

Tổng số 830 mẫu có kết quả siêu âm độ mờ da gáy (NT) phát hiện 31 mẫu NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 3,7%, trong đó thai phụ có NT ≥ 4mm có kết quả NIPS dương tính chiếm tỷ lệ cao nhất là 57,1%. Tiếp theo là thai phụ có NT từ 3 - 3,9mm có kết quả NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 25%. Thai phụ có NT < 3mm có kết quả NIPS dương tính chiếm tỷ lệ thấp nhất là 7,8%. Sự khác biệt về tỷ lệ NIPS dương tính giữa các nhóm có kích thước NT khác nhau là có ý nghĩa thống kê với p = 0,000.

3.3.8. Kết quả NIPS dương tính liên quan đến sàng lọc huyết thanh

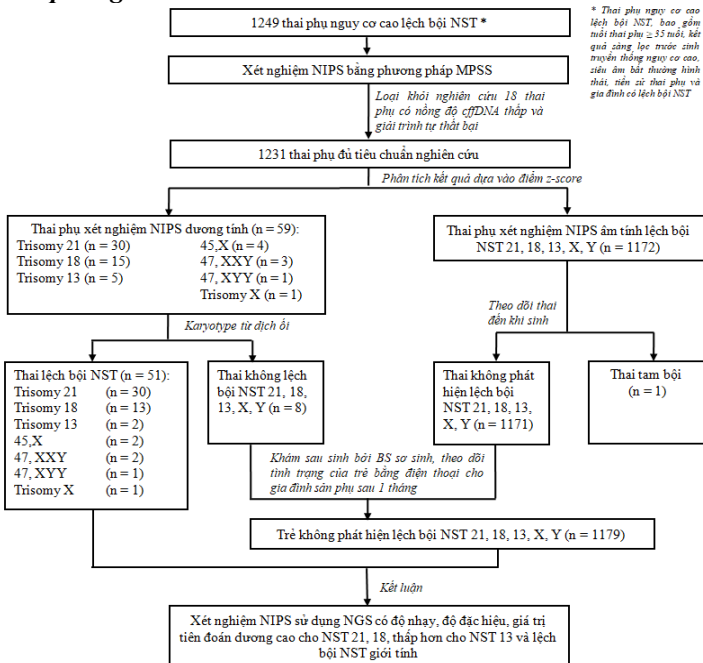
Bảng 3.13. NIPS dương tính liên quan đến sàng lọc huyết thanh

SLHT	NIPS		Tổng	P (χ^2 test)
	Dương tính	Âm tính		
$\geq 1/10$	03 (27,3%)	08 (72,7%)	11 (100%)	0,000
1/11 - 1/50	04 (3,3%)	116 (96,7%)	120 (100%)	
1/51 - 1/100	01 (0,5%)	205 (99,5%)	206 (100%)	
1/101 - 1/250	01 (0,2%)	461 (99,8%)	462 (100%)	
Tổng	14 (1,75%)	785 (98,25%)	799 (100%)	

Ghi chú: SLHT: sàng lọc huyết thanh thai phụ

Trong số 814 mẫu có kết quả sàng lọc huyết thanh thai phụ nguy cơ cao có 799 mẫu nguy cơ cao trisomy 21, trong đó kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 1,75%, trong đó mẫu có nguy cơ cao $\geq 1/10$ chiếm tỷ lệ cao nhất là 27,3%, tiếp theo là mẫu có nguy cơ cao từ 1/11 - 1/50 chiếm tỷ lệ 3,3%. Mẫu có nguy cơ cao trong khoảng 1/51 đến 1/250 chiếm tỷ lệ thấp là 0,7%. Sự khác biệt về tỷ lệ xét nghiệm NIPS dương tính giữa các nhóm sàng lọc huyết thanh nguy cơ cao là có ý nghĩa thống kê với $p = 0,000$.

3.3.6. Kết quả nghiên cứu



* Thai phụ nguy cơ cao lệch bội NST, bao gồm một thai phụ ≥ 55 tuổi, kết quả sàng lọc trước sinh truyền thống nguy cơ cao, siêu âm bất thường hình thái nên sử dụng phụ và gia đình có lệch bội NST

Sơ đồ 3.1. Sơ đồ tóm tắt kết quả nghiên cứu

Chương 4: BÀN LUẬN

Nghiên cứu được thực hiện trên 1231 thai phụ có nguy cơ cao mang thai mắc trisomy 21, 18 và 13 do sàng lọc bằng các xét nghiệm trước sinh truyền thống. Các đối tượng nghiên cứu được lựa chọn đúng theo các tiêu chuẩn đã được đưa ra trong phần đối tượng và phương pháp nghiên cứu. Thai phụ có tuổi trên 35 tuổi chiếm tỷ lệ cao. Tuổi thai trung bình trong nghiên cứu là 15 - 16 tuần, tuổi thai trong khoảng 14 - 20 tuần 6 ngày chiếm đa số. Đối tượng thai phụ được lựa chọn vào nghiên cứu hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của McCullough và cộng sự. Cho đến nay, tất cả các hiệp hội liên quan đến chuyên ngành sản phụ khoa trên thế giới đều có sự thống nhất rằng phân tích nồng độ cfDNA từ huyết tương thai phụ sử dụng phương pháp MPSS hoặc CSS hoặc SNPs là xét nghiệm tốt nhất sàng lọc lệch bội NST thai. Trong các phương pháp tiếp cận, hàng triệu đoạn DNA ngắn được giải trình tự đồng thời, khớp, lập bản đồ và so sánh với trình tự chuẩn bộ gen người (hg19) sử dụng các thuật toán khác nhau để có thể phát hiện bất kỳ một sự thay đổi nhỏ nào gây ra lệch bội NST. Hầu hết cfDNA trong huyết tương thai phụ có nguồn gốc từ tế bào rau thai, trong khi đó tỷ lệ lớn DNA tự do của thai phụ có nguồn gốc từ các tế bào máu. Vấn đề đáng lo ngại nhất trong thu nhận mẫu máu từ thai phụ là sự gia tăng các DNA tự do của thai phụ sau khi lấy máu do thoái hóa các tế bào bạch cầu, dẫn đến giảm nồng độ cfDNA. Nghiên cứu sử dụng ống chuyên dụng Streck BCTs chứa chất kháng đông là K3EDTA và các chất bảo quản có hiệu quả giúp kéo dài thời gian xử lý huyết tương, vận chuyển mẫu trong điều kiện nhiệt độ phòng và giúp ngăn chặn sự thoái hóa các tế bào bạch cầu. Sử dụng hệ thống tự động tách chiết DNA tự do cho thấy nồng độ DNA dao động trong khoảng 2,24 - 11,7ng/ μ L, cao hơn hẳn so với các phương pháp tách chiết DNA tự do bằng tay. Điều này cũng hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Houfflin-Debarge. Kết quả tạo thư viện DNA và kiểm tra chất lượng thư viện DNA cho thấy khoảng 80% kích thước thư viện phù hợp với chiều dài đoạn DNA tự do. Trong giai đoạn tối ưu quy trình giải trình tự trong nghiên cứu, DNA thư viện gắn mã vạch đã được pha loãng theo nồng độ 55pM cho thấy hiệu quả tối ưu nhất cho tỷ lệ polyclonal thấp hơn so với các nồng độ khác. Hệ thống giải trình tự gen thế hệ mới Ion Torrent sử dụng chip bán dẫn đếm proton (ion H⁺). Mẫu thư viện DNA được nhân bản trong môi trường emulsion PCR (ePCR) có các thành phần của phản ứng PCR và hạt ISP (Ion Sphere Particle), bề mặt các hạt ISP có phủ hàng triệu các adapter có thể bắt cặp bổ sung với adapter P1. Trong điều kiện tối ưu, 1 giọt dầu môi trường ePCR chỉ chứa 1 hạt ISP và 1 đoạn thư viện DNA. DNA thư viện sau khi được gắn lên bề mặt hạt ISP sẽ được khuếch đại và nạp vào chip giải trình tự. Chất lượng nạp mẫu nạp vào chip giải trình tự được biểu thị bằng biểu đồ nhiệt, màu sắc càng càng đỏ cho thấy mật độ hạt ISP được nạp vào giếng càng cao. Trong nghiên cứu, thực hiện 102 lần giải trình tự với 115 chip (mỗi lần giải trình tự từ 1 đến 2 chip, với số mẫu tối đa là 14 mẫu/1 chip), kết quả giải trình tự

cho thấy mật độ hạt ISP trung bình nạp vào chip đạt 88,5%, thấp nhất là 72% vẫn đạt tiêu chuẩn. Khoảng $60,6 \pm 5,8\%$ hạt ISP đạt chất lượng (tương đương 78,9 triệu giếng hay đoạn đọc DNA), trung bình có 5,86 triệu lần đọc DNA thô trên một mẫu, chiều dài trung bình đoạn đọc DNA là 161bp, tương đương với kích thước DNA tự do trong huyết tương đã được báo cáo bởi Lo và cộng sự. Thuật toán TMAP (Torrent Mapping Alignment Program) được chứng minh là 1 trong 2 thuật toán tốt nhất để phát hiện lệch bội NST thai sử dụng công nghệ giải trình tự bán dẫn. Toàn bộ trình tự đoạn đọc DNA được khớp và so sánh với trình tự hg19 sử dụng thuật toán TMAP. Kết quả dữ liệu nghiên cứu cho thấy 99,6% các đoạn đọc DNA sắp xếp vào trình tự hg19 với chiều dài trung bình khoảng 160,5bp, tương đương với vùng khảo sát khi kiểm tra chất lượng thư viện, các đoạn đọc DNA có kích thước ngắn sẽ có điểm chính xác gần cao. Điểm chính xác tiếp tục duy trì đôi với các đoạn đọc DNA có độ dài dưới 180bp (đạt 98,8% độ chính xác). Trong tổng số đoạn đọc DNA có khả năng sắp xếp vào hg19 thì các đoạn đọc DNA đạt chất lượng AQ17 và AQ20 chiếm tỷ lệ cao, chứng tỏ quá trình giải trình tự đạt yêu cầu về chất lượng. Trong nghiên cứu, tỷ lệ thất bại chung của xét nghiệm NIPS là 1,44%, trong đó 1,36% nguyên nhân do nồng độ cffDNA thấp. Yếu tố chính dẫn đến nồng độ cffDNA thấp là do thai phụ béo phì hoặc khối lượng rau thai nhỏ vì lấy mẫu ở tuổi thai sớm trước 10 tuần hoặc cả 2 yếu tố trên. Nồng độ cffDNA thấp còn có thể do thai mắc trisomy 18, trisomy 13, monosomy X và thể tam bội (triploidy). Kết quả nghiên cứu phù hợp với nghiên cứu của McCullough et al và cộng sự báo cáo tỷ lệ thất bại là 1,3% khi sử dụng phương pháp MPSS, kết quả tương đồng với nghiên cứu đánh giá tỷ lệ thất bại từ các phương pháp giải trình tự, với MPSS có tỷ lệ thất bại thấp nhất là 1,58%, tiếp theo là CSS là 3,56% và cao nhất là 6,39% với SNPs. Một số phòng xét nghiệm tư vấn nên lặp lại xét nghiệm NIPS trong trường hợp thất bại, tuy nhiên, tỷ lệ thất bại khi lặp lại xét nghiệm có thể lên tới 40 - 50% và tỷ lệ lệch bội NST cao hơn đáng kể trên những thai phụ không có kết quả NIPS. Vì lý do này, ACOG và SMFM khuyến nghị những thai phụ không nhận được kết quả NIPS nên được tư vấn di truyền, kiểm tra bằng siêu âm và thủ thuật xâm lấn. Hầu hết các nghiên cứu về xét nghiệm NIPS được công bố đều sử dụng điểm z-score để đưa ra kết luận xét nghiệm NIPS dương tính hay âm tính. Trong nghiên cứu, điểm z-score NST 21, 18, 13 và NST X đều phân bố theo biểu đồ chuẩn. Để phân tích độ chính xác của xét nghiệm NIPS, ngoài việc sử dụng điểm z-score còn sử dụng rất nhiều yếu tố khác như nồng độ cffDNA, số lượng đọc trình tự duy nhất (URs), phương pháp giải trình tự và thuật toán được sử dụng. Kết quả giải trình tự trong nghiên cứu cho thấy điểm z-score cao nhất của NST 21, 18, 13 ở ngưỡng không phát hiện lệch bội NST lần lượt là 2,77; 2,8; 2,57. Ngưỡng z-score của NST X không phát hiện lệch bội NST giới tính dao động trong khoảng từ - 2,9 đến 2,9. Kết quả nghiên cứu cho thấy 1172 mẫu có điểm z-score không phát hiện lệch bội NST hay mẫu NIPS âm tính

chiếm tỷ lệ 95,21%. 59 mẫu có điểm z-score trong ngưỡng phát hiện lệch bội NST hay mẫu NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 4,79%, trong đó: 30 mẫu trisomy 21, 15 mẫu trisomy 18, 05 mẫu trisomy 13, 04 mẫu monosomy X, 03 mẫu 47,XXY, 01 mẫu 47,XYY và 01 mẫu trisomy X. Kết quả nghiên cứu hoàn toàn đồng với nghiên cứu của Maxwell, Shan và cộng sự gọi ý trên 95% thai phụ có thể tránh được thủ thuật xâm lấn nếu được tư vấn xét nghiệm NIPS. Điều này không những làm giảm chi phí, áp lực, mà còn đưa ra giải pháp an toàn cho thai phụ, tránh được tai biến mất thai do thủ thuật xâm lấn. Nếu tất cả 1172 thai phụ được chỉ định làm thủ thuật xâm lấn thì có tới 2 - 3 thai phụ có khả năng mất thai, vì tỷ lệ mất thai do thủ thuật xâm lấn là 0,11% - 0,22%. Độ nhạy và độ chính xác của xét nghiệm NIPS phụ thuộc nhiều vào nồng độ cfDNA trong huyết tương thai phụ. Nồng độ cfDNA tỷ lệ thuận với độ nhạy xét nghiệm NIPS, vì vậy, tìm ra phương pháp có độ nhạy và độ chính xác cao là rất cần thiết. Nghiên cứu đã sử dụng phương pháp đếm số lượng đoạn đọc DNA trong môi NST (phương pháp dựa trên dữ liệu giải trình tự có độ bao phủ thấp DNA từ huyết tương thai phụ - SeqFF). Kết quả cho thấy nồng độ cfDNA có phân bố chuẩn và có xu hướng tăng dần theo tuổi thai tương ứng. Nồng độ cfDNA từ 10 - 20 tuần 6 ngày tăng nhẹ có ý nghĩa thống kê. Nồng độ cfDNA ở tuổi thai ≥ 21 tuần tăng nhanh có ý nghĩa thống kê. Kết quả nghiên cứu tương đồng với nhiều nghiên cứu trên thế giới như nghiên cứu của Zimmermann, Dar, Hudcova và cộng sự. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ trung bình cfDNA là 7,79%, thấp hơn so với các nghiên cứu khác. Điều này có thể lý giải do các nghiên cứu có cỡ mẫu dao động lớn và thiết kế nghiên cứu khác nhau, sử dụng các phương pháp giải trình tự và các thuật toán khác nhau nên nồng độ cfDNA thu được từ các nghiên cứu cũng dao động khác nhau. Nhiều nghiên cứu báo cáo không có sự khác biệt về nồng độ cfDNA tuổi thai từ 10 - 22 tuần, nồng độ cfDNA tăng nhanh sau 21 tuần. Nghiên cứu có số lượng thai phụ mang thai ≥ 21 tuần chiếm tỷ lệ thấp là 4,79% (59/1231 mẫu) có thể là 01 lý do dẫn đến nồng độ cfDNA thấp trong nghiên cứu. Tiếp theo, có một số yếu tố như thao tác xử lý tách huyết tương, phương pháp tách DNA và các kit hóa chất sử dụng cũng ảnh hưởng đáng kể đến nồng độ cfDNA lưu hành trong huyết tương thai phụ. Nghiên cứu với cỡ mẫu chưa đủ lớn, chưa thể đại diện cho nồng độ cfDNA của thai phụ, cần có những nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để có thể xây dựng ngưỡng nồng độ cfDNA của thai phụ Việt Nam. Kết quả phát hiện mối tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cfDNA và BMI của thai phụ, kết quả phù hợp với rất nhiều nghiên cứu trên thế giới như Ashoor, Revello, Scott và cộng sự. Tăng BMI và béo phì có tương quan với tăng nguy cơ kết quả NIPS thất bại. Do đó, có những hạn chế trong việc sử dụng xét nghiệm NIPS ở nhóm thai phụ béo phì. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu cho thấy tuổi thai phụ cũng có mối tương quan nghịch đến nồng độ cfDNA, tuy nhiên mối tương quan rất yếu. Nghiên cứu của Revello và cộng sự (2016), Hou và cộng sự (2019) cũng cho kết quả tương đồng.

Trong nghiên cứu, nồng độ cffDNA cao hơn trên nhóm thai phụ mang thai mắc trisomy 21 và trisomy 18 so với nhóm thai phụ có kết quả NIPS âm tính với lệch bội NST từ 10 tuần đến 20 tuần 6 ngày, tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ cffDNA giữa 2 nhóm thai phụ. Nghiên cứu của Ashoor và cộng sự (2013), Rava và cộng sự (2014) cho thấy nồng độ cffDNA ở tuần thai từ 11 - 13 tuần trong trường hợp trisomy 21 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm xét nghiệm NIPS âm tính, trong trường hợp trisomy 18, 13, nồng độ cffDNA thấp hơn so với nhóm xét nghiệm NIPS âm tính. Nghiên cứu của Suzumori và cộng sự trên 6.993 thai phụ có tuổi thai từ 10 – 20 tuần thai cũng cho kết quả nồng độ cffDNA thấp hơn đáng kể trong trường hợp trisomy 18, 13 so với trường hợp xét nghiệm NIPS âm tính, tuy nhiên nồng độ cffDNA tương đương trong trường hợp trisomy 21 và trường hợp xét nghiệm NIPS âm tính. Trong khi, Kinnings và cộng sự chứng minh rằng ảnh hưởng lệch bội NST đến nồng độ cffDNA thay đổi theo tuổi thai. Khi so sánh các mẫu NIPS âm tính, nồng độ cffDNA tăng từ 16 tuần thai với mẫu trisomy 21. Tương tự, nồng độ cffDNA giảm từ 21 tuần và 18 tuần tương ứng với trisomy 18 và 13. Do vậy, các lệch bội NST thai khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến nồng độ cffDNA, tùy thuộc vào NST bị ảnh hưởng. Nghiên cứu bị giới hạn về số lượng mẫu trisomy 18 phát hiện được với tuổi thai từ 10 tuần đến 20 tuần 6 ngày ($n = 7$), có thể vì vậy nồng độ cffDNA trong trisomy 18 cao hơn trường hợp NIPS âm tính. Nồng độ cffDNA có mối tương quan thuận với điểm z-score, khi nồng độ cffDNA tăng, điểm z-score của trisomy 21, 18, 13 tăng mạnh trong khi điểm z-score của các trường hợp NIPS âm tính vẫn duy trì ổn định, mối tương quan có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Liao và cộng sự. Nghiên cứu cho thấy mối tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và điểm z-score trường hợp 45,X. Không tìm thấy mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và điểm z-score trường hợp NIPS âm tính với trisomy 13, 18, 21 và lệch bội NST giới tính. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với nghiên cứu của Xu-Ping Xu và cộng sự. Hiện nay, kết quả phân tích NST vẫn là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán trước sinh, là cơ sở để so sánh và đánh giá giá trị của các kỹ thuật mới trong sàng lọc và chẩn đoán trước sinh. 59 mẫu NIPS dương tính sử dụng thủ thuật xâm lấn hút dịch ối phân tích bộ NST, kết quả có 08 mẫu có bộ NST bình thường (46,XX; 46,XY) chiếm 13,6% và 51 mẫu trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính được phát hiện chiếm 86,4%. Xét nghiệm NIPS có khả năng phát hiện cao vượt trội và tỷ lệ dương tính giả thấp hơn so với các xét nghiệm sàng lọc trước sinh truyền thống (có tỷ lệ dương tính giả từ 2 - 5%). Tuy nhiên, xét nghiệm NIPS vẫn gặp kết quả dương tính giả và âm tính giả, nguyên nhân có thể do khả năng khu trú rau thai (CPM), khảm thai phụ, biến thể số lượng bản sao của thai phụ (CNV), mất thai trong thai đôi, thai phụ mắc ung thư ác tính, khảm thai thực sự (TFM) và thậm chí do sai sót từ phòng xét nghiệm. Nghiên cứu phát hiện 08 thai phụ có kết quả dương tính giả với trisomy 18, 13 và lệch

bội NST giới tính và 01 thai phụ có kết quả âm tính giả với lệch bội NST giới tính. Tỷ lệ dương tính giả của xét nghiệm NIPS với trisomy 13 tương đối cao (3/5), có thể liên quan đến kích thước của NST 13 hoặc hàm lượng GC trên NST 13. Ngoài ra, nồng độ cffDNA và điểm z-score có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ dương tính giả xét nghiệm NIPS. Nghiên cứu của Yuan và cộng sự cho thấy xét nghiệm NIPS có điểm z-score ≥ 9 có độ chính xác cao hơn khi điểm z-score trong khoảng $3 \leq z\text{-score} < 5$ hoặc $5 \leq z\text{-score} < 9$. Các mẫu dương tính giả với trisomy 18, 13 trong nghiên cứu đều có cffDNA thấp $\leq 8\%$ và điểm z-score trong khoảng $3 \leq z\text{-score} < 5$ phù hợp với hướng dẫn của Hội Thai phụ khoa Mỹ (ACOG) năm 2015, cho thấy nồng độ cffDNA và điểm z-score thấp là nguyên nhân chính của các trường hợp xét nghiệm NIPS thất bại. Nghiên cứu phát hiện 03 trường hợp NIPS dương tính giả với lệch bội NST giới tính đều có điểm z-score < -5 . Một trường hợp NIPS âm tính giả với 47,XYY, kết quả giải trình tự là thai nam với tín hiệu NST Y cao là 0,001043 (tín hiệu NST Y với giới tính nam có ngưỡng $\geq 0,0003$). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Li và cộng sự, và theo nhiều nghiên cứu, kiểu nhiễm sắc thể XXY và XYY rất khó đánh giá trong xét nghiệm NIPS. Do vậy, với kết quả NIPS dương tính nên chỉ định thủ thuật xâm lấn phân tích bộ NST lập karyotype để chẩn đoán xác định. Nghiên cứu cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm NIPS là 100% và 99,6% với trisomy 21, 18, 13. Trong đó, độ nhạy và độ đặc hiệu cho trisomy 21 là cao nhất tương đương các báo cáo trên thế giới. Giá trị tiên đoán âm cho cả 3 loại trisomy 21, 18, 13 là 100% tương đồng với kết quả nghiên cứu của Sekelska và cộng sự năm 2019 cho thấy giá trị tiên đoán âm cho trisomy 21, 18, 13 là 99,99%. Giá trị tiên đoán dương trong nghiên cứu phát hiện trisomy 21 cao nhất là 100%, tiếp theo là trisomy 18 với tỷ lệ 87%, giá trị tiên đoán dương của trisomy 13 tương đối thấp là 40%, tương đương các nghiên cứu trên thế giới. Điều này có thể liên quan đến tần xuất trisomy 13 thấp hơn có ý nghĩa so với trisomy 21 và trisomy 18. Hơn nữa, số trường hợp trisomy 13 trong mỗi nghiên cứu là khác nhau và dẫn đến giá trị tiên đoán dương trisomy 13 có sự khác biệt giữa các nghiên cứu. Nghiên cứu phát hiện lệch bội NST giới tính (SCAs) có độ nhạy là 83,3% (95% CI: 35,9 - 99,6) và độ đặc hiệu là 99,8% (95% CI: 99,3 - 99,9%); giá trị tiên đoán dương là 62,5% (95% CI: 24,5 - 91,5%). Độ nhạy và giá trị tiên đoán dương (PPV) cho SCAs có khoảng tin cậy dao động trong khoảng rộng do số lượng mẫu trong nghiên cứu thấp. Trong các loại lệch bội NST giới tính, PPV với 47,XYY là thấp nhất = 0,0%; tiếp theo là 45,X chiếm 50,0%; 47,XXY là 66,7%; PPV cao nhất là 47,XXX là 100,0%. Nghiên cứu của Hooks và cộng sự đã chỉ ra xét nghiệm NIPS sử dụng phương pháp MPSS có độ nhạy cao là 92,6% và tỷ lệ dương tính giả thấp dưới 1,0% với SCAs. ACOG chỉ ra độ nhạy và độ đặc hiệu phát hiện SCAs là 91,0% và 99,6%. Nghiên cứu của Xue và cộng sự cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu cao, tuy nhiên PPV rất khác nhau với từng loại SCAs, thấp nhất là monosomy X với tỷ lệ 28,57%, tiếp theo là

66,67% với 47,XXY, 80,0% với 47,XXX và cao nhất là 47,XXY với 92,31%. Nghiên cứu chỉ phát hiện được 9 trường hợp SCAs, trong đó 3 trường hợp dương tính giả và 1 trường hợp âm tính giả, do vậy có sự khác biệt về PPV so với các nghiên cứu khác. Hầu hết, SCAs không có triệu chứng lâm sàng rõ ràng hoặc bất thường trên siêu âm, do vậy, hạn chế của nghiên cứu là chỉ có thể khám trẻ sau sinh và điện thoại cho sản phụ nhằm xác định tình trạng của trẻ mà không thể chẩn đoán chính xác tất cả các trường hợp âm tính giả với lệch bội NST giới tính.

Nghiên cứu trên 1231 mẫu cho kết quả giá trị tiên đoán dương do siêu âm bất thường hình thái chiếm tỷ lệ cao nhất. Đặc biệt, những thai phụ có siêu âm bất thường hình thái kết hợp NT \geq 4mm có kết quả NIPS dương tính chiếm tỷ lệ cao nhất. Nghiên cứu của Beulen và cộng sự năm 2017 cho thấy không nên tư vấn xét nghiệm NIPS trên những thai phụ có bất thường hình thái trên siêu âm, vì cả độ nhạy hoặc giá trị tiên đoán âm đều thấp hơn so với xét nghiệm karyotype. Xét nghiệm NIPS dương tính liên quan đến xét nghiệm sàng lọc huyết thanh thai phụ nguy cơ cao trisomy 21 cho thấy với nguy cơ cao \geq 1/10, tỷ lệ xét nghiệm NIPS dương tính là cao nhất, kết quả của nghiên cứu hoàn toàn phù hợp với báo cáo của Persico và cộng sự năm 2016. Hiệp hội siêu âm quốc tế về thai phụ khoa (ISUOG) khuyến cáo tốt nhất không nên tư vấn xét nghiệm NIPS mà nên chỉ định thủ thuật xâm lấn cho những trường hợp CFTS có nguy cơ rất cao \geq 1/10 và độ mờ da gáy \geq 4mm. Nghiên cứu đã cho thấy một số kết quả rất có ý nghĩa của xét nghiệm NIPS đối với thực hành lâm sàng, giúp làm giảm thủ thuật xâm lấn không cần thiết. Xét nghiệm sàng lọc trước sinh truyền thống và siêu âm đóng vai trò rất quan trọng trong giúp các thầy thuốc lâm sàng có thể đưa ra chỉ định xét nghiệm NIPS và thủ thuật xâm lấn phù hợp với từng đối tượng thai phụ.

KẾT LUẬN

1. Ứng dụng được phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới phát hiện lệch bội NST 21, 18, 13, X, Y bằng DNA thai tự do trong máu mẹ.

- Tỷ lệ xét nghiệm NIPS thất bại là 1,44%, trong đó nguyên nhân do nồng độ cfDNA thấp $<$ 3,5% chiếm tỷ lệ 1,36% và nguyên nhân do giải trình tự thất bại chiếm tỷ lệ 0,08%.

- Nghiên cứu đã tối ưu/hoàn thiện quy trình giải trình tự: thư viện DNA đã gắn mã vạch được pha loãng theo nồng độ 55pM, nạp tối đa là 14 mẫu trên 1 chip giải trình tự.

- Tỷ lệ xét nghiệm NIPS dương tính bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới phân tích cfDNA là 4,79% (59 mẫu dương tính/ 1231 mẫu).

2. Bước đầu đánh giá giá trị của phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới sử dụng DNA thai tự do trong máu mẹ.

- Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương và giá trị tiên đoán âm chung cho trisomy 21, 18, 13 và lệch bội nhiễm sắc thể giới tính lần lượt là 99,8%; 99,3%; 86,2% và 99,9%.

- Nhiễm sắc thể 21, 18, 13: độ nhạy, độ đặc hiệu giá trị tiên đoán âm cao cho cả 3 hội chứng Down, Edwards và Patau; giá trị tiên đoán dương cao nhất cho hội chứng Down (trisomy 21) là 100%, tiếp theo là hội chứng Edwards (trisomy 18) là 87% và thấp nhất là hội chứng Patau (trisomy 13) là 40%. Giá trị tiên đoán dương cho cả 3 hội chứng là 90%.

- Nhiễm sắc thể giới tính (X, Y): độ đặc hiệu và giá trị tiên đoán âm cao cho các loại lệch bội nhiễm sắc thể giới tính, độ nhạy bằng 0,0% cho hội chứng Jacob (47,XY^Y), giá trị tiên đoán dương thấp nhất cho hội chứng Jacob là 0,0%, tiếp theo là hội chứng Turner (45,X) là 50,0%. Độ nhạy và giá trị tiên đoán dương cho lệch bội NST giới tính là 83,3% và 62,5%.

- Xét nghiệm NIPS bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới phân tích cfDNA có giá trị cao phát hiện hội chứng Down, hội chứng Edwards, nhưng thấp hơn với hội chứng Patau, hội chứng Jacob và hội chứng Turner.

KIẾN NGHỊ

- Nên tư vấn xét nghiệm NIPS sớm cho thai phụ từ 10 tuần thai có nguy cơ cao lệch bội NST.

- Nên chỉ định xét nghiệm NIPS phù hợp với từng đối tượng thai phụ dựa trên kết quả sàng lọc trước sinh truyền thống và siêu âm: hạn chế chỉ định xét nghiệm NIPS ở nhóm thai phụ béo phì, không nên chỉ định xét nghiệm NIPS ở nhóm thai phụ ≥ 45 tuổi, thai phụ có kết quả sàng lọc trước sinh nguy cơ rất cao $\geq 1/10$, thai phụ có kết quả siêu âm hình thái bất thường và độ mờ da gáy cao $\geq 3,5$ mm.

- Với kết quả xét nghiệm NIPS dương tính, nên tư vấn thai phụ thủ thuật xâm lấn làm xét nghiệm karyotype.

- Khi kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với lệch bội NST giới tính, nên tư vấn thai phụ làm thêm xét nghiệm karyotype từ máu.

- Nên tư vấn trước và sau xét nghiệm NIPS về giá trị của xét nghiệm NIPS với lệch bội NST, đặc biệt là lệch bội NST 13 và NST giới tính để tránh sang chấn về tâm lý cho thai phụ khi nhận được kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với hội chứng Patau và lệch bội NST giới tính.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Hoàng Hải Yến, Nguyễn Duy Ánh, Đinh Thùy Linh, Tạ Thành Văn (2017). Đánh giá kết quả sàng lọc trước sinh phát hiện hội chứng Down từ DNA thai tự do trong huyết tương thai phụ. *Tạp chí y học Việt Nam*, 458 (9), số đặc biệt, 161-168.
2. Hoàng Hải Yến, Nguyễn Duy Ánh, Đinh Thùy Linh, Tạ Thành Văn (2018). Nghiên cứu phát hiện sớm hội chứng Edwards bằng sàng lọc trước sinh không xâm lấn. *Tạp chí Y học thực hành*, 1066 (1), 52-54.
3. Hoàng Hải Yến, Nguyễn Duy Ánh, Nguyễn Minh Hiền, Tạ Thành Văn (2019). Giá trị của DNA thai tự do trong sàng lọc trước sinh không xâm lấn phát hiện lệch bội nhiễm sắc thể thai sử dụng công nghệ giải trình tự bán dẫn dựa vào phương pháp seqFF. *Tạp chí Nghiên cứu y học*, 119(3), 23-32.
4. Hoàng Hải Yến, Nguyễn Duy Ánh, Nguyễn Minh Hiền, Tạ Thành Văn (2019). Bước đầu đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến DNA thai tự do trong huyết tương mẹ. *Tạp chí phụ sản*, 17(02), 11-17.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING

MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



HOANG HAI YEN

**STUDY THE VALUE OF NEXT-GENERATION
SEQUENCING METHOD TO DETECT FETAL
CHROMOSOMAL ANEUPLOIDIES BY CELL FREE
FETAL DNA IN MATERNAL BLOOD**

Specialized in : Biochemistry

Code : 62720112

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Hanoi - 2020

Research completed in:
HANOI MEDICAL UNIVERSITY

Advisors: Prof. PhD. TA THANH VAN
Ass Prof. PhD. NGUYEN DUY ANH

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

The Thesis will be defended in front of The Council for Philosophy
Doctor in Medicine at Hanoi Medical University
At:.....

The Thesis can be found at:

- The National Library
- Hanoi Medical University Library

INTRODUCTION

1. Rationale of the study

Fetal chromosomal abnormalities have been reported to occur in 1 of 150 live births, one of the leading causes of infant mortality and morbidity worldwide. Approximately 83% of these abnormalities are due to trisomy 21, 18, 13 and sex chromosome aneuploidies leading to Down, Edwards, Patau, Turner syndrome....

To date, there are no measures in the world for preventing pregnancy from chromosomal abnormalities. Therefore, early detection of chromosomal abnormalities by prenatal screening and diagnosis and genetic counseling is essential to reduce the incidence of chromosomal abnormalities. Noninvasive prenatal screening for aneuploidy include sonographic and biochemical markers in maternal blood of the [first-trimester](#) and second-trimester. There is a false-positive rate of approximately 5% và detection rates of 50 - 95%, depending on the specific screening strategy used. While the screening tests are designed to identify high risk, invasive procedures are considered diagnosis test, such as chorionic villus sampling or amniocentesis to investigate the number of chromosomes using karyotype, QF-PCR, FISH, MLPA and Prenatal BoBs. However, both tests carry procedure-related risks of miscarriage at 0,11% - 0,22%. Therefore, it is necessary to have screening methods with lower false positive and higher detection rate, this would lead to a decrease in the number of pregnant women taking the procedure-related risks of miscarriage.

Noninvasive prenatal screening by new generation sequencing method analyzes cell free fetal DNA in maternal blood, helps early screening of fetuses in various aspects, such as: early determination of sex pregnancy helps predict the likelihood of the prenatal diagnosis of sex-linked disorders; risk of fetal hereditary diseases in high-risk families; Determining RhD blood group of fetus; Predict the risk of pre-eclampsia; among which is the application of cell free fetal DNA analysis in screening chromosomal aneuploidy (NIPS test). This is considered a significant step forward in the field of noninvasive prenatal screening, since cell free fetal DNA sampling and analysis does not require deep intervention, risk reduction and fetal complications for pregnant women and fetus. In addition, the NIPS test has a detection rate of trisomy 21, 18, 13 over 99% with low false positive rate less than 1%.

2. Objectives of the study

1. *Application of the next-generation sequencing to detect aneuploidies of 21, 18, 13, X, Y chromosomes by cell free fetal DNA in maternal blood.*
2. *Determining the aneuploidy ratio of 21, 18, 13, X, Y chromosomes and initial evaluation the value of the next-generation sequencing using cell free fetal DNA in maternal blood.*

3. Place of the study

The project was implemented at the Prenatal - Neonatal Screening and Diagnosis Center, Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital; Department of Biochemistry, Hanoi Medical University.

4. Contribution of the thesis

- Applied the next-generation sequencing procedure in cell-free DNA sequencing-based noninvasive prenatal screening for trisomies 21, 18, 13 and sex chromosome aneuploidy in pregnant woman's plasma. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value of trisomy 21, 18, 13 and chromosome aneuploidy have been determined.

- The results of the study have high clinical applicability, especially for pregnancy who have been tested for traditional prenatal screening at high risk for chromosomal aneuploidy, helping to decrease in the number of pregnant women taking the procedure-related risks of miscarriage, minimize the risk as well as complications in pregnant women and the fetus.

5. Scientific and practical significance of the topic

Research significant practical contribution provides a diagnostic technique modern international level, providing clinicians another screening method of prenatal non-invasive high precision, reduced false positive rate, can apply to women from early gestation week.

The project is innovative, new and up-to-date, successfully implementing the new-generation sequencing technique to screen fetal chromosomal anomalies in Vietnam for the first time.

6. Thesis structure

- The thesis is presented in 131 pages (excluding references and appendices). The thesis is divided into 7 parts: Introduction 2 pages; Chapter 1: Literature review 37 pages; Chapter 2: Subjects and research methods 16 pages; Chapter 3: Research results 34 page; Chapter 4: Discussion 39 page; Conclusion 2 pages; Recommended 1 page.

- The thesis consists of 33 tables, 25 charts, 15 figures and 2 diagrams, with 191 references, including 06 Vietnamese documents and 185 English documents. The appendix includes techniques used in the study, patient information sheets and list of patients participating in the study.

Chapter 1: OVERVIEW

1.1. Abnormal chromosome pregnancy

1.1.1. Frequency of appearance

The most common chromosomal abnormalities are trisomy 21, 18, 13 and sex chromosomal aneuploidies, which result in Down, Edwards, Patau, Turner, Klinefelter syndrome ... According to General Office for population planning, nearly 1,5 million babies are born in Vietnam each year, of which the birth defect rate accounts for about 1,5 – 2,0% of the live births. It is noteworthy that there are approximately 1.400 - 1.800 children with trisomy 21 and about 200 - 250 children with trisomy 18 each year.

1.1.2. Consequences of chromosomal abnormalities

Chromosomal aberrations pose a threat to at least 7,5% of all conception cases, and they present in up to 50% of first trimester abortions and stillbirths. The frequency of major chromosomal abnormalities is estimated to be between 1/150 to 1/200 of live births. 3,0% to 4,0% of live births are associated with a major congenital malformation, mental retardation, or genetic disorder. This rate doubles when children reach 7 - 8 years of age, with later-appearing or later-diagnosed genetic disorders.

1.2. Overview of some screening tests and prenatal diagnosis to detect chromosomal abnormalities

1.2.1. Traditionally screened aneuploidies

- Maternal age: The risk for fetal aneuploidy increases along with maternal age. Advanced maternal age (35 years old or older) is classified as a high-risk group. Currently, about 15% of pregnant women are ≥ 35 years old and the detection rate of pregnancies carrying trisomy 21 fetuses is approximately 50%.

- Sonography: Many structural abnormalities can be detected by ultrasound scan during the first trimester of pregnancy, some of which can be related to trisomy 21, 18, or 13. Nuchal translucency (NT) is the most representative sonographic marker studied during the first trimester of pregnancy.

- Prenatal screening by biochemical markers

First trimester screening (11th to 14th weeks' gestation)

First trimester combined screening test is carried out from 11th to 14th weeks' gestation based on maternal age, NT combining quantitatively with F β -hCG and PAPP-A in maternal serum, and algorithms to assess the risks of carrying trisomy 21, 18, and 13. This test has been reported to detect about 90% of pregnancies carrying trisomy 21 fetuses with a false positive rate of 5%.

Second trimester screening (15th to 22th weeks' gestation)

Second trimester screening test is carried out from 15th to 22th weeks' gestation based on maternal age combining quantitatively with hCG, AFP, uE3 and Inhibin A in maternal serum, then based on the algorithm for assessing the risk of trisomy 21, 18, and neural tube defects.

1.2.2. Methods of prenatal diagnosis

- *Methods of sampling in prenatal diagnosis*

Invasive sampling methods such as chorionic villus sampling or amniocentesis directly affect the fetus and can cause complications for pregnant women (abortion, amniotic fluid...).

Non-invasive sampling method helps pregnant women avoid the procedure-related risks of miscarriage. Maternal blood can be used for fetal cell or cell free fetal DNA analysis.

- *Genetic techniques applied in prenatal diagnosis*

Analysis techniques for making karyotype chromosomes, Fluorescent in situ hybridization (FISH), Quantitative Fluorescence - Polymerase Chain Reaction (QF-PCR), Array Comparative Genomic Hybridization (array CGH), Prenatal BoBs (PN BoBs)

1.3.1. Origin and characteristics of cell free fetal DNA in maternal plasma

Cell free fetal DNA (cffDNA) are short DNA fragments derived from placenta, length of which are about 150 to 200 bp, and 10 - 20% of which are between 10 - 21 weeks' gestations, and cffDNA increases as gestational age increases. The average half-life of cffDNA is 16,3 minutes (4 - 30 minutes), cffDNA cannot be detected after 2 hours of birth.

1.3.2. Factors affecting cffDNA

Lo et al proved that cffDNA is positively correlated with gestational age and negatively correlated with maternal weight and maternal body mass index (BMI). cffDNA are 1,6 times higher in twin gestations compared to singleton gestations, and hypertension can also reduce cffDNA. The concentration of cffDNA increased in trisomy 21 and decreased in trisomy 18, trisomy 13, monosomy X and triploidy. Factors such as maternal age, fetal sex, nuchal translucency, pregnant women with diabetes, thyroid disease, hepatitis B virus infection (HBsAg) do not affect cffDNA.

1.3.3. Applications of cffDNA in pregnant plasma

Identifying the sex of the fetus; Diagnosis of single-gene disorders; Determining RhD blood group of fetus; Predict the risk of pre-eclampsia; Paternity testing; Identifying aneuploidy...

1.4. Next-generation sequencing in cffDNA analysis

1.4.1. Principle of the next-generation sequencing

The next generation sequencing (high-throughput sequencing and massively parallel sequencing) works on the same synthetic principle as DNA sequencing by the Sanger method, in which DNA polymerase synthesizes DNA sequences using dNTP attached to the 3' end of DNA sequences are synthesized on an additional principle. However, for new generation sequencing, instead of sequencing a single fragment, this technique allows sequencing with a large number of different DNA

fragments in parallel at the same time, thereby saving the time and output extremely large data compared to the old Sanger method.

+ Illumina sequencing principle using Sequencing By Synthesis (SBS) technology combined with the use of nucleotides with fluorescent signals and reversible stop locks to read and identify the order directly.

+ Ion Torrent or Ion semiconductor sequencing: Determining nucleotide sequences in DNA through detecting electrical signals due to H⁺ ions released during DNA synthesis by micro pH meter attached to semiconductor touch chip.

1.4.2. Application of next-generation sequencing in NIPS test

There are three currently in use methods for cffDNA analysis: sequencing DNA fragments from the whole genome with Massive Parallel Shotgun Sequencing (MPSS), targeted sequencing or selectively sequencing specific genomic regions of interest by MPS (CSS), and sequencing by genotyping analysis based on Single Nucleotide Polymorphism (SNPs). Each analytical method uses different bioinformatics algorithms and statistical methods to assess the risk of chromosomal aneuploidies.

1.4.3. Research on applying next generation sequencing in analyzing cffDNA to detect chromosomal aneuploidies in the world

Fan et al. (2008) first introduced the technique of quantitative chromosome counting in prenatal screening research to detect chromosomal aneuploidies from maternal blood using MPSS.

Since 2011, a number of major Obstetricians and Gynecologists and genetic organizations around the world have published suggestions for the use of NIPS during gestations. The suggestions are consistent with the use of the NIPS in pregnant women at high risk. To determine the accuracy of NIPS, a meta-analysis of Gil et al in 2015 showed that the detection rates of trisomy 21, 18, 13 and monosomy X were 99,2%; 96,3%; 91%; 90,3% respectively and the false positive rates of trisomy 21, 18, 13 were 0,09%; 0,13%; 0,13%; 0,23% respectively.

1.4.4. Research on NIPS test in Vietnam

In Vietnam, studies of cell free fetal DNA(cffDNA) analysis in prenatal screening and diagnosis are still limited. In 2010, Nguyen Thanh Thuy and her colleagues used nested PCR technique to detect cffDNA from maternal serum and applied it in prenatal diagnosis. In 2014, Trieu Tien Sang et al. initially developed a cell free DNA extraction procedure detecting cffDNA in pregnant woman's plasma by PCR technique. In 2019, Nguyen Thi Phuong Lan and her colleagues used Realtime PCR technique to detect cffDNA in maternal plasma for early pre-eclampsia prediction.

Chapter 2

SUBJECTS AND METHODS OF RESEARCH

2.1. Subjects of the study

Pregnant women in high risk based on first or second trimester screening result in Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital from 2016 to 2019.

2.1.1. Selection criteria

Singleton pregnant women from 10 week's gestations who are in high risk based on conditional screening result and have at least one of the following criteria are selected as the subjects of study:

- Maternal age of 35 years or older at delivery.
- Fetal ultrasound findings indicating an increased risk of aneuploidy.
- History of a prior pregnancy with a trisomy, stillbirths, or multiple abortion. A family history of people with aneuploidy.
- Positive first or second-trimester screening test results for aneuploidy (risk $\geq 1/250$).
- Agreement to participate in the study.

2.1.2. Exclusion criteria

The pregnancies are not selected as an object of research:

- Pregnancies < 10 weeks' gestations.
- Multiple gestation pregnancies or abortion twins (Vanishing Twins).
- Pregnancies performed transplant surgery, using stem cell therapy.
- Pregnancies received blood transfusions within 3 months.
- Pregnant women who are given eggs or surrogate.
- Women with chromosome abnormalities, pregnancies infected malignant cancer.
- Pregnancies did not agree to participate in the study.

2.2. Research methods

2.2.1. Research design

The study has the cross-section descriptive, combining with actual comparison (the condition of the child at birth...) 1 month after birth.

2.2.2. Study sample size

Based on the formula for calculating the sample size for diagnostic studies, the sample size of the study is 1231 eligible women agreed to participate in the study.

2.2.3. Research facilities

- *Machine and tools*

Automatic DNA extraction machine, double-stranded DNA sequences spectral analyzer, PCR machine, preparing and handling pattern on a semiconductor chip (Ion Chef) machine, next-generation sequencing using semiconductor chip (Ion Proton) machine, and Streck BCT tubes.

- *Chemicals*

Free DNA splitting chemicals, chemicals that analyze the size and concentration of DNA, double-stranded DNA's concentration measuring chemicals, DNA using magnetism purification chemicals, sample preparation and PCR chemical, chemicals attaching DNA barcode to the sample substances, sample preparation on the semiconductor chip chemicals, semiconductor chip used for the sequencing.

2.2.4. The process of conducting research

- Procedure: 10ml of whole blood of pregnant women is taken into Streck BCT's tubes, then plasma and cell free DNA are extracted. The cell free DNA will be used for a library of DNA and used to check the quality of DNA library and to prepare DNA library on Ion Chef (enriched sample library DNA will be automatically loaded into the chip sequencing Ion PI V3) and sequenced on Ion Proton machine.

- Analysis of results: Using the algorithm based on YOUNGENE's SeqFF counting method applied in automatic bioinformatics analysis software to calculate cffDNA ratio per sample and z-score for each chromosome in each sample could be calculated. Samples with high data noise $\geq 3,5$ and low number of DNA fragments < 2 million are failed sequences. Samples with cffDNA $< 3,5\%$ will not return NIPS results because they do not guarantee test's accuracy.

+ A z-score ≥ 3 was used a cut-off for calling trisomy 13, 18, 21, X.

+ Cases of maternal carrying male fetus: z-score ≥ 3 (47,XXY), z-score ≤ -3 (47,XYY); cases of maternal carrying female fetus: z-score ≤ -3 (45,X).

- Diagnosis determined for pregnant women with positive NIPS results: Invasive procedure of amniotic fluid, cell culture, karyotype for analysis of fetal chromosomes is done according to G band as a gold standard to control next-generation sequencing method.

- Pregnancy monitoring for pregnant women with negative NIPS results: Monitoring the pregnancy until delivery at Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital, newborns will be examined immediately after birth by the neonatal doctors and they will monitor the baby's condition by phone for pregnant women and families after 1 month.

2.2.5. Statistical analysis

Using Epidata 3.1 software to enter data, STATA 14 software (StataCorp - Texas 77845 USA) for data analysis. Use linear correlation (Pearson) to find the correlation between 2 consecutive random variables. Use one-way ANOVA test with Bonferroni correction to find different groups. P-values $< 0,05$ were considered statistically significant.

2.3. Ethics in the research

The study has been approved by the Ethics Council of Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital, according to No. 09/PSHN-HĐĐĐ. The study subjects consent to participate in research; samples of positive NIPS results are free of charge from invasive procedures and karyotype, and they are kept as confidential informations.

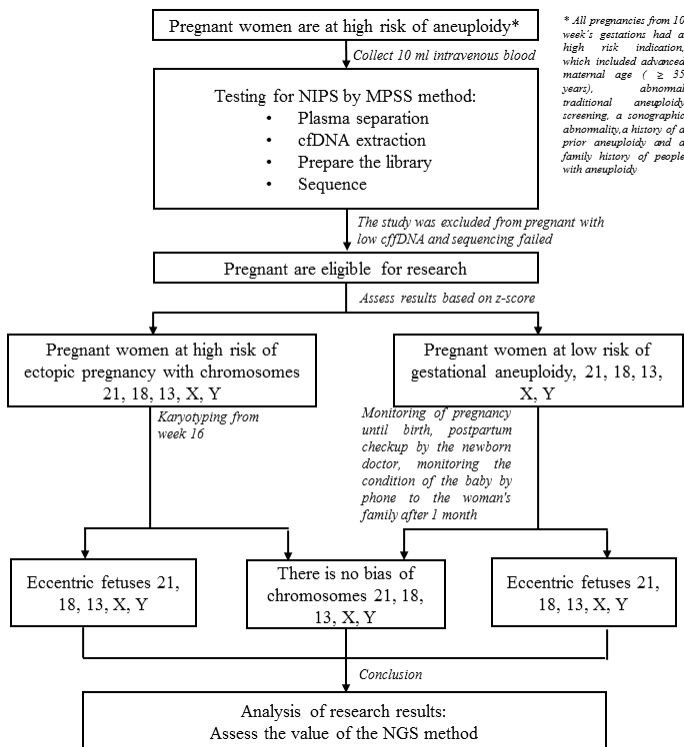


Diagram 2.1. Diagram of research

Chapter 3 RESEARCH RESULTS

3.1. Application of next generation sequencing in analyzing cffDNA to detect chromosomal aneuploidies

3.1.1. General characteristics of the samples in the research

Table 3.1. General characteristics of the samples in the research

Characteristics	Value
Average maternal age (years)	34,3 ± 5,7 (17-47)
Average gestational ages (weeks)	15,2 ± 3,1 (10-30)
10-13 weeks 6 days (n,%)	468 (38,02%)
14-20 weeks 6 days (n, %)	704 (57,19%)
≥ 21 weeks (n, %)	59 (4,79%)

The study was conducted on 1231 pregnant women with an average age of 34,3 ± 5,7 years. The average gestational ages are 15,2 ± 3,1 weeks. The gestational age of 10 - 20 weeks and 6 days accounts for a high rate of 95,21%.

Table 3.2. Risk factors for pregnant women have a NIPS test

Risk factors	Number		
	n	Total	%
Advanced maternal age	694	1231	56,4
Sonographic abnormality	123	1231	10,0
Traditional aneuploidy screening	814	1231	66,1
History	95	1231	7,7
> 1 risk factor	467	1231	37,9

1231 women with risk factors were ordered. In particular, abnormal traditional aneuploidy screening accounted for the highest rate of 66,1%, followed by the group of advanced maternal age accounting for 56,4%, and women with sonographic abnormality results accounting for 10%. These group of pregnant women have a history of abnormal births or using drugs before or during pregnancy, history of miscarriage, stillbirth, a history of a prior aneuploidy, a family history of people with aneuploidy accounts for the lowest rate of 7,7%.

3.1.2. Isolation of cell-free DNA and DNA library construction

Table 3.1. Cell free DNA concentration and DNA library concentration

Concentration (ng/μL)	n	$\bar{X} \pm SD$	Min - Max	95% CI
Cell-free DNA	1231	4,37±1,17	2,24-11,7	4,36-4,38
DNA library	1231	2,93±1,68	0,051-18,6	2,92-2,94

The average cell free DNA concentration is 4,37 ± 1,17ng/μL (95% CI, 4,36 - 4,38ng/μL) with a range of 2,24 - 11,7ng/μL. The average concentration of cell free DNA library collected after library preparation is 2,93 ± 1,68ng/μL (95% CI: 2,92 - 2,94ng/μL) with ranges from 0,051 - 18,6ng/μL.

3.1.2. Results of sequencing quality

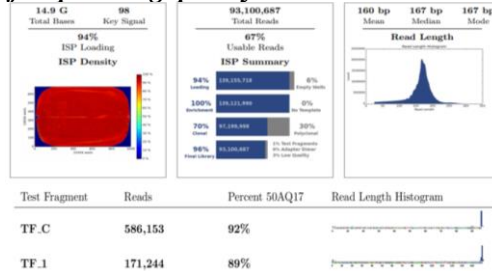


Figure 3.1. Effective load of samples into sequencing chips

Figure 3.1 illustrates the results of sequencing on one chip: The DNA library after being attached to the surface of the ISP particle (Ion Sphere Particle) will be cloned and loaded into the sequence chip.

Table 3.2. ISP quality's results on sequencing chips

Results of sequencing	Chip	$\bar{X} \pm SD$	Min - Max	95% CI
Total base (Gb)	115	13,3±6,9	7,4-15,6	12,1-14,9
Density ISP (%)	115	88,5±4,8	72-94	88-89,8
Quality ISP (%)	115	60,6±5,8	40-69	59,6-61,8
Well with ISP particles (million)	115	79±11	47-95	77-81

Results of 102 sequences on 115 chips (1 sequence on 1-2 chips with 14 samples/chip) showed that the amount of raw data ranged from 7,4 to 15,6Gb, an average of $13,3 \pm 6,9$ Gb (95% CI, 12,1 - 14,9Gb). The density of ISP particles loaded into the wells ranges from 72 - 94% with an average of $88,5 \pm 4,8$ % (95% CI, 88 - 89,8%). Quality ISP particles account for an average of $60,6 \pm 5,8$ %, ranging from 40 - 69%, or about 79 ± 11 million wells or the number of DNA readings.

3.1.3. Failure rate of the NIPS test

Table 3.3. Failure rate of the NIPS test

Cause	1 st		2 nd	
	n	%	n	%
Low cffDNA concentration	47/1249	3,76	17/1249	1,36
High noise sequencing data	4/1249	0,32	1/1249	0,08
Low DNA read numbers	4/1249	0,32	0/1249	0
Total	55/1249	4,4	18/1249	1,44

Out of 1249 eligible samples selected for study, there were 4,4% of failed samples after the first sequence. Results of the second sequence had 32,7% of failed samples. Therefore, the failure rate of the NIPS test in the study was 1,44%, in which low cffDNA concentration accounted for 1,36% and high data noise accounted for 0,08%.

3.1.4. Result of sequencing

Table 3.4. Result of sequencing

Characteristics	$\bar{X} \pm SD$	Min - Max	95% CI
cffDNA concentration (%)	7,79 \pm 3,04	3,51-24,59	7,62-7,96
DNA read numbers	4,4 \pm 1,1	2,0-17,7	4,3-4,5

Using Yougene's SeqFF algorithm, the average cffDNA concentration is 7,79 \pm 3,04%, ranging from 3,51 - 24,59% (95% CI, 7,62 - 7,96%). The average number of DNA fragments per sample is 4,4 \pm 1,1 million, ranging from 2,0 to 17,7 million (95% CI, 4,3 - 4,5 million).

Table 3.5. Results z-score of chromosomes 21, 18, 13, X

z-score	Chromosome			
	21	18	13	X
euploidy (max)	2,57	2,8	2,77	2,9
euploidy (min)	-4,59	-3,12	-3,99	-2,9
aneuploidy (max)	20,34	31,26	11,22	9,963
aneuploidy (min)	3,19	3,53	3,22	-8,41

The sequencing results showed that there were 1172 euploidy and 59 aneuploidy samples; z-score of trisomy 13 (n = 5) ranged from 3,22 to 11,22; z-score of trisomy 18 (n = 15) ranged from 3,53 to 31,26; z-score of trisomy 21 (n = 30) ranged from 3,19 to 20,34; z-score of monosomy X (n = 4) ranges from -8,41 to -3,52; z-score of 47,XXY (n = 3) ranges from 4,05 to 5,38; z-score of 47,XYY is -4,08 (n = 1); z-score of 47,XXX is 9,963 (n = 1).

3.2. Determine the abnormal ratio of chromosome 21, 18, 13, X, Y and evaluation the value of next-generation sequencing using cell-free fetal DNA in pregnant woman's plasma

3.3.1. Result of NIPS

Table 3.6. Result of NIPS

Result of NIPS	Number	
	n	%
Negative	1172	95,21
Positive	59	4,79
Total	1231	100

Sequence 1231 samples of pregnant women found 59 samples with positive NIPS results accounted for 4,79% (59/1231), and 1172 pregnancies with negative NIPS results accounted for 95,21% (1172/1231)

Table 3.7. Result of NIPS

Result of NIPS	Number	
	n	%
Trisomy 21	30	50,8
Trisomy 18	15	25,4
Trisomy 13	5	8,5
Monosomy X	4	6,8
47,XXY	3	5,1
47,XYY	1	1,7
Trisomy X	1	1,7
Total	59	100

59 positive NIPS samples had 30 positive samples with trisomy 21 accounting for the highest rate of 50,8%; followed by 15 positive samples with trisomy 18 accounting for 25,4%; 5 positive samples with trisomy 13 accounted for 8,5%. Sexual chromosome anomalies accounted for 15,3% (of which 6,8% were positive for monosomy X; 5,1% positive for 47,XXY; 1,7% positive for 47,XYY and 1,7% of samples were positive for 47,XXX).

3.3.2. The value of cffDNA in NIPS test

3.3.2.1. cffDNA and gestational age

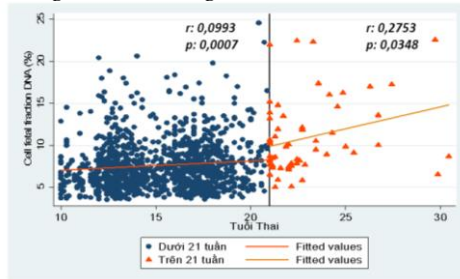


Chart 3.1. cffDNA and gestational age

cffDNA increased slightly in pregnant women have gestational age from 10 to 20 weeks 6 days, found a statistically significant correlation between cffDNA and gestational age from 10 to 20 weeks 6 days, $p = 0,0007$. For the pregnant women with gestational age ≥ 21 weeks, cffDNA is proportional to gestational age, cffDNA increased rapidly with gestational age, found a statistically significant correlation between cffDNA and gestational age ≥ 21 weeks, $p = 0,0348$.

3.3.2.2. cffDNA and maternal weight, BMI

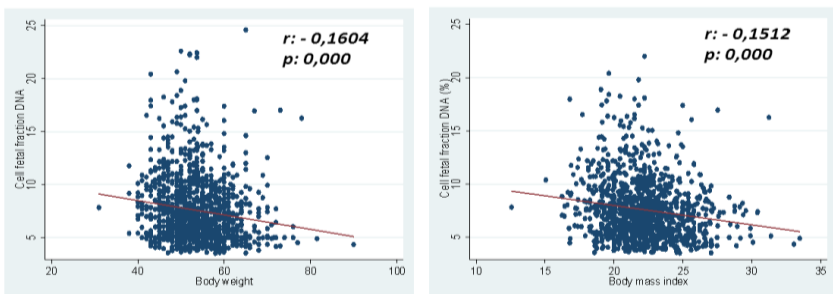


Chart 3.2. cffDNA and maternal weight, BMI

cffDNA is inversely proportional to the maternal weight, BMI, the cffDNA decreased as the weight, BMI increased, finding a statistically significant difference between cffDNA levels and weight, BMI, $p = 0,000$.

3.3.2.3. *cffDNA and trisomy 21,18*

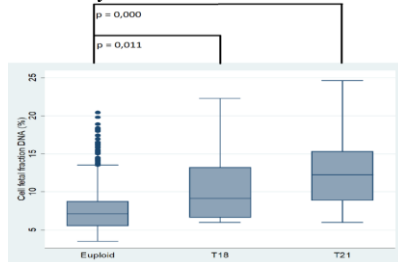


Chart 3.3. *cffDNA and trisomy 18, 21*

20 pregnant women with NIPS positive results trisomy 21 and 07 positive women with trisomy 18 have gestational age from 10 to 20 weeks 6 days, of which *cffDNA* in positive NIPS with trisomy 21 and trisomy 18 respectively were 12,55% and 10,55% were statistically higher than *cffDNA* in negative NIPS was 7,5% ($p = 0,000$ and $p = 0,011$).

3.3.2.4. *cffDNA and z-score chromosome of 21, 18, 13, X*

The study found a significant positive correlation between *cffDNA* and z-score in the NIPS positive group with trisomy 21, 18, and 13, $p < 0,001$. The correlation was statistically significant between *cffDNA* and z-score for positive NIPS with monosomy X, $p < 0,001$. No statistically significant correlation was found between *cffDNA* and z-score in positive NIPS cases with 47,XXY, $p > 0,05$. No statistically significant correlation was found between *cffDNA* and z-score of the chromosome 13, 18, 21, X in negative NIPS, $p > 0,05$.

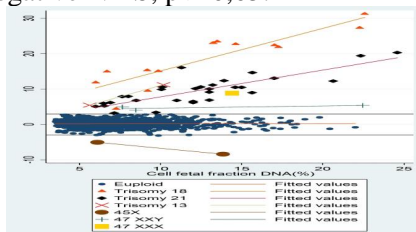


Chart 3.4. *cffDNA and z-score of chromosome 21, 18, 13, X*

3.3.3. *Results of chromosome analysis on samples were positive NIPS results*

59 aneuploidy samples were indicated for invasive procedures by amniocentesis for confirmation diagnosis. 8 samples showed a normal and 51 samples had aneuploidy results, of which: 29 trisomy 21 and 01 mosaic trisomy 21 (mos 47,XX,+21[8]/46,XX[72]), 12 trisomy 18 and 01 unbalanced transition pattern between chromosome 18, 21 produces long trisomy 18, [46,XX,der(21)t(18;21)(p11;q11)], 02 trisomy 13, 01 monosomy X and 01 structural mutation pattern cause deficiency of

necessary genes on long branch chromosome X [46,X,i (Xq)] , 02 of 47,XXY, 01 of 47,XXX, 01 trisomy X.

3.3.4. The value of the NIPS in screening for chromosomal aneuploidies

Table 3.8. The value of the NIPS

NIPS (+)	Rate % (95% CI)				Incidence %
	Se	Sp	PPV	NPV	
T21, 18, 13	100,0 (92,1-100,0)	99,6 (99,0-99,9)	90,0 (78,2-96,7)	100,0 (100,0-100,0)	3,65
SCAs	83,3 (35,9-99,6)	99,8 (99,3-99,9)	62,5 (24,5-91,5)	99,9 (99,5-100,0)	0,41
Total	99,8 (89,6-100,0)	99,3 (98,7-99,7)	86,2 (74,6-93,9)	99,9 (99,5-100,0)	4,06

Notes: Trisomy: T; Se: sensitivity; Sp: specificity; PPV: Positive predictive value; Sex chromosomal aneuploidies: SCAs.

Sensitivity for trisomy 21, 18, 13 and sex chromosomal aneuploidy is 100,0% (95% CI: 92,1 - 100,0%) and 83,3% (95% CI: 35,9 - 99,6%). The overall sensitivity is 99,8% (95% CI: 89,6 - 100,0%). Specificity for trisomy 21, 18, 13 are 99,6% (95% CI: 99,0 - 99,9%), sex chromosomal aneuploidies are 99,8% (95% CI: 99,3 - 99,9%). The overall specificity is 99,3% (95% CI: 98,7 - 99,7%). PPV for trisomy 21, 18, 13 and sex chromosomal aneuploidies are 90% (95% CI: 78,2 - 96,7%) and 62,5% (95% CI: 24,5 - 91,5%). The overall PPV is 86,2% (95% CI: 74,6 - 93,9%). The incidence of trisomy 21, 18, 13 and sex chromosomal aneuploidies are 3,65% and 0,41%. The rate of chromosomal aneuploidy is 4,06%.

Table 3.9. Positive NIPS results for trisomy 21, 18, 13

NIPS (+)	Rate % (95% CI)				Incidence %
	Se	Sp	PPV	NPV	
T21	100,0 (88,0-100,0)	100,0 (100,0-100,0)	100,0 (88,0-100,0)	100,0 (100,0-100,0)	2,44
T18	100,0 (75,0-100,0)	99,8 (99,0-100,0)	87,0 (60,0-98,0)	100,0 (100,0-100,0)	1,05
T13	100,0 (16,0-100,0)	99,8 (99,0-100,0)	40,0 (5,0-85,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,16
Tổng	100,0 (92,1-100,0)	99,6 (99,0-99,9)	90,0 (78,2-96,7)	100,0 (100,0-100,0)	3,65

Notes: Trisomy: T; Se: sensitivity; Sp: specificity; PPV: Positive predictive value; NPV: negative predictive value.

Sensitivity for trisomy 21 is 100,0% (95% CI, 88,0 - 100,0%), trisomy 18 is 100,0% (95% CI, 75,0 - 100,0%), trisomy 13 is 100,0% (95% CI, 16,0 - 100,0%). The common sensitivity for three types of trisomy is 100,0% (95% CI, 92,1 - 100,0%). The specificity for trisomy 21 is 100,0% (95% CI, 100,0 - 100,0%), trisomy 18 and 13 are 99,8% (99,0 - 100,0%). The specificity for three types of trisomy are 99,6% (95% CI, 99,0 -

99,9%). The highest PPV of trisomy 21 is 100,0% (95% CI, 88,0 - 100,0%), followed by trisomy 18 is 87% (95% CI, 60 - 98%), the lowest trisomy 13 is 40,0% (95% CI, 5,0 - 85,0%). The PPV and NPV for three types of trisomy are 90% (95% CI, 78,2 - 96,7%) and 100% (95% CI, 100,0 - 100,0%). The incidence of trisomy 21, 18 and 13 are 2,44%; 1,05%; 0,16%; The overall incidence of trisomy 21, 18 and 13 are 3,65%.

Table 3.10. Positive NIPS results with sex chromosomal aneuploidies

NIPS (+)	Rate % (95% CI)			
	Se	Sp	PPV	NPV
45,X	100,0 (15,8-100,0)	99,8 (99,4-100,0)	50,0 (6,76-93,2)	100,0 (99,7-100,0)
47,XXY	100,0 (15,8-100,0)	99,9 (99,5-100,0)	66,7 (9,43-99,2)	100,0 (99,7-100,0)
47,XYY	0,0 (0,0-97,5)	99,9 (99,5-100,0)	0,0 (0,0-97,5)	99,9 (99,5-100,0)
47,XXX	100,0 (2,5-100,0)	100,0 (99,7-100,0)	100,0 (2,5-100,0)	100,0 (99,7-100,0)
Total	83,3 (35,9-99,6)	99,8 (99,3-99,9)	62,5 (24,5-91,5)	99,9 (99,5-100)

Notes: Se: sensitivity; Sp: specificity; PPV: Positive predictive value; NPV: negative predictive value.

The sensitivity for 45,X; 47,XXY are 100% (95% CI, 15,8 - 100%); 47,XXX is 100% (95% CI, 2,5 - 100%). The sensitivity for 47,XYY is 0,0% (95% CI, 0,0 - 97,5%). The sensitivity for SCAs is 83,3% (95% CI, 35,9 - 99,6%). Specificity and NPV for SCAs are 99,8% (95% CI, 99,3 - 99,9%) and 99,9% (95% CI, 99,5 - 100,0%). The PPV of 47,XYY is the lowest, accounting for 0,0% (95% CI, 0,0 - 97,5%), followed by 45,X accounting for 50,0% (95% CI, 6,76 - 93,2%), 47,XXY is 66,7% (95% CI, 9,43 - 99,2%), the highest is trisomy X accounting for 100% (95% CI, 2,5 - 100%). PPV for SCAs are 62,5% (95% CI, 24,5 - 91,5%).

3.3.5. NIPS results based on risk factors

Table 3.11. Positive predictive value of NIPS for each risk factor

Characteristic	n, %	NIPS (+)	Karyotype		95% CI PPV%
			TP	FP	
Maternal age	694 (56,4%)	25 (3,6%)	20	05	80,0 (59,3-93,2)
Maternal serum	814 (66,1%)	16 (2,0%)	12	04	75,0 (47,6-92,7)
Ultrasound	123 (10,0%)	23 (18,7%)	22	01	95,7 (78,1-99,9)
> 1 RF	467 (37,9%)	23 (4,9%)	21	02	91,3 (72-98,9)

Note: RF: Risk factors; TP: true positive; FP: false positive; PPV: Positive predictive value

The positive NIPS rate is 18,7% for an abnormal morphological ultrasound, and the highest PPV is 95,7%; the following positive NIPS rate higher by over one risk factor accounted for 4,9%, and the PPV is 91,3%; the positive NIPS rate due to the maternal age is 3,6%, and a PPV accounted for 80,0%; the positive NIPS rate from maternal serum screening accounted for the lowest rate of 2,0%, the PPV due to maternal serum screening accounts for the lowest rate of 75,0%.

3.3.6. Positive NIPS results related to abnormal ultrasound

Table 3.12. Positive NIPS results is related to nuchal translucency

NT (mm)	NIPS (n, %)		Total (n, %)	P (χ^2 test)
	Positive	Negative		
< 2	18 (2,5%)	710 (97,5%)	728 (100,0%)	0,000
2 - 2,9	04 (5,3%)	71 (94,7%)	75 (100,0%)	
3 - 3,9	05 (25,0%)	15 (75,0%)	20 (100,0%)	
4 - 5,8	04 (57,1%)	03 (42,9%)	07 (100,0%)	
Total	31 (3,7%)	799 (96,3%)	830 (100,0%)	

31/830 positive NIPS samples (3,7%) have ultrasound result of the nuchal translucency (NT), of which the highest positive NIPS results rate have $NT \geq 4mm$ is 57,1%; following by NT from 3 - 3.9mm accounting for 25,0%; $NT < 3mm$ accounting for the lowest rate of 7,8%. The difference in positive NIPS rates among NT-related groups is statistically significant with $p = 0,000$.

3.3.7. Positive NIPS results related to serum screening

Table 3.13. Positive NIPS results related to serum screening

Screening of serum	NIPS (n, %)		Total (n, %)	P (χ^2 test)
	Positive	Negative		
$\geq 1/10$	03 (27,3%)	08 (72,7%)	11 (100%)	0,000
1/11 - 1/50	04 (3,3%)	116 (96,7%)	120 (100%)	
1/51 - 1/100	01 (0,5%)	205 (99,5%)	206 (100%)	
1/101 - 1/250	01 (0,2%)	461 (99,8%)	462 (100%)	
Total	14 (1,75%)	785 (98,25%)	799 (100%)	

Among 814 material serum screening samples, 799 samples were at high risk for trisomy 21, after the sequence of detection of 14 (1,75%) positive NIPS samples, of which risk $\geq 1/10$ had positive NIPS results was the highest rate (27,3%), followed by risk from 1/11 to 1/50 with positive NIPS results accounted for 3,3%. Samples with risk from 1/51 to 1/250 with positive NIPS results account for a lowest rate of 0,7%.

The difference in positive NIPS rates among high-risk groups was statistically significant with $p = 0,000$.

3.3.5. Diagram of research results

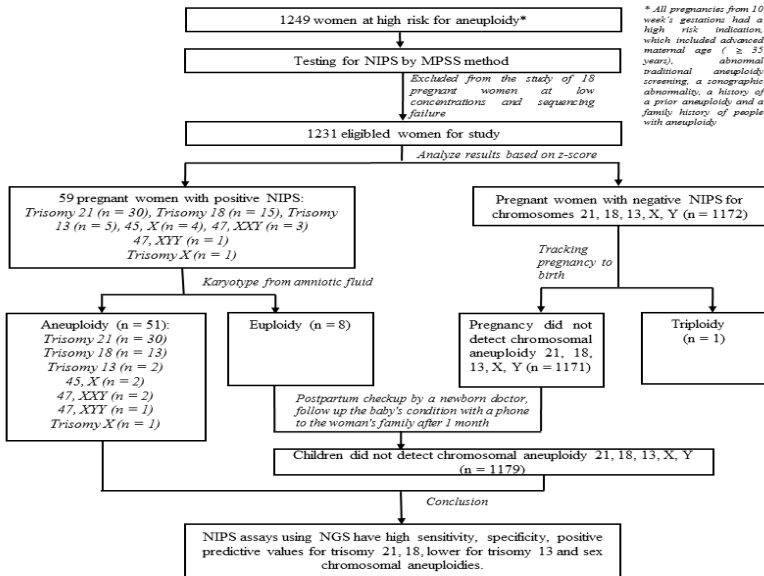


Diagram 3.1. Diagram of research results

Chapter 4: DISCUSSION

The study was conducted on 1231 women who were screened at high risk of pregnancy trisomy 21, 18 and 13. The study subjects were selected according to the criteria set out in the section of subjects and methods. Pregnant women over 35 years old accounted for a high proportion. The average gestational age in the study was 15 - 16 weeks, the gestational age from 14 to 20 weeks 6 days accounted for a high rate. Subjects selected for the study were completely consistent with the study of McCullough et al. So far, all the associations related to obstetrics and gynecology in the world have agreed that determining cfDNA from maternal plasma by whole genome sequencing (MPSS) or target sequencing (CSS or SNPs) are the best tests for fetal aneuploidies. In these approaches, millions of short DNA fragments are sequenced, aligned, mapped, and compared to the reference genome of humans using different algorithms. Then, the number of sequences generated from the different chromosomes was compared to detect any minor changes that caused chromosomal aneuploidy. Most cfDNA in maternal plasma is derived from placenta, while a large rate of the maternal cell free DNA is derived from blood cells. The most

worrisome problem in collecting blood samples from maternal is the increase in cell free DNA of maternal due to degeneration of white blood cells, leading to a decrease in cffDNA concentration. The study used Streck BCTs specialized tubes containing K_3EDTA and antifreeze reagents effectively inhibited nuclease within 14 days, helping to prolong the time of plasma processing, storage and sample transport in room temperature conditions and helps prevent the degradation of white blood cells. Fetal cells remain in the fetal circulation many years after giving birth. In contrast, cffDNA disappear 2 hours after birth. Therefore, cffDNA is the most suitable option in noninvasive prenatal screening. The cell-free DNA extraction method used is critical to the cffDNA obtained. Studies using automatic extraction systems show that the cell free DNA in the range of 2,24 - 11,7ng/ μL is much higher than the manual extraction methods. This is also completely consistent with the research of Houfflin-Debargé which shows that using the automatic extraction methods, the concentration of cffDNA is 40,7% higher than that of the manual methods. Result of library creation and quality control of DNA libraries show that approximately 80% of the library size corresponds to the length of the cell free DNA fragment. In the optimal phase of the sequencing process in the study, the DNA library that has been bar coded has been diluted to 55pM concentration, showing the best effect for lower polyclonal ratios compared to other concentrations. Next-generation sequencing system uses a proton semiconductor chip that counts (H^+ ions). Library samples cloned in an emulsion PCR (ePCR) environment have components of the PCR reaction and the ISP (Ion Sphere Particle), the surface of the ISP is covered with millions of adapters that can be additionally paired with adapters P1. Under optimal conditions, one drop of ePCR environment contains only one ISP and one DNA library fragment. The DNA library after being attached to the surface of the ISP will be cloned and loaded into the sequence chip. The quality of the sample loaded into the sequence chip is represented by a heat graph, the redder the color indicates the higher the density of ISP loaded into the well. In the study, 102 sequences with 115 chips were performed (each order from 1 to 2 chips, with a maximum of 14 samples per chip), the results showed that the ISP particle density Average chip load is 88,5%, the lowest is 72% meeting standards. Approximately $60,6 \pm 5,8\%$ of ISP particles got quality (equivalent to 78,9 million wells or DNA fragments), an average of 5,86 million readings of raw DNA per sample, average length of DNA reading is 161bp, which is equivalent to cell free DNA size reported by Lo et al. The TMAP algorithm (Torrent Mapping Alignment Program) created by Nils Homer and colleagues from Life Technologies has proven to be one of two the best algorithms for detecting fetal chromosomal aneuploidy using semiconductor

sequencing technology. The total reads sequences are aligned and compared with the sequence hg19 using TMAP algorithm. The results of the research data show that 99,6% of the DNA fragments are aligned in hg19 sequence with an average length of about 160,5bp, equivalent to the survey area when checking the quality of the library. Regular short DNA fragment sizes will have high accuracy points. Accuracy point continues for DNA fragments below 180bp (98,8% accuracy). Of the total reads that are likely to be aligned in hg19, the DNA fragments of AQ17 and AQ20 quality have a high proportion, proving that the sequencing process meets the quality requirements. In the study, the overall failure rate of the NIPS test was 1,44%, of which 1,36% was caused by low cffDNA. The main factor leading to low cffDNA is due to obesity in pregnant women or small volume of placenta due to sampling at early gestation before 10 weeks or a combination of these two factors. Low cffDNA can also be caused by fetus with trisomy 18, trisomy 13, monosomy X and triploidy. The study results are consistent with the study of McCullough et al reported a failure rate of 1,3% when using the MPSS method. The results are similar to the study evaluating the failure rate from the sequencing methods, with MPSS, having the lowest failure rate of 1,58%, followed by CSS with 3,56% and the highest is 6,39% with SNPs. Some laboratories consult there should be repeated NIPS test in case of failure, however, the rate of failure when the test is repeated can be up to 40 - 50% and the rate of chromosome aneuploidy is significantly higher in pregnant women who do not have NIPS results. For this reason, ACOG and SMFM recommend that women who do not receive NIPS results should receive genetic counseling, ultrasound and invasive procedures. Most published NIPS tests have used the z-score to conclude whether a NIPS test is positive or negative. In the study, z-score of chromosomes 21, 18, 13, X were all distributed according to the Gaussian chart. To analyze the accuracy of the NIPS test, besides using z-score, many other factors such as cffDNA level, number of DNA readings, sequencing methods and algorithms are used. The sequencing results in the study showed that the highest z-score of chromosomes 21, 18 and 13 at the threshold of not detecting aneuploidy is 2,77; 2,8; 2,57. The z-score threshold for chromosome X does not detect aneuploidy, ranging from -2,9 to 2,9. The study results showed that 1172 (95,21%) pregnancies had negative NIPT results; 59 (4,79%) pregnancies had positive NIPT results, including 5 for T13, 15 for T18, 30 for T21, 9 for sex chromosome aneuploidies (4 monosomy X, 3 for 47,XXY, 1 for 47,XYY and 01 for trisomy X). The results of the study are similar to those of Maxwell, Shan and colleagues suggest that over 95% of pregnant women can avoid invasive procedures if they are consulted to perform NIPS test. This not only reduces costs, reduces

pressure for pregnant women, but also provides a safe solution for pregnant women, avoiding complications of abortion due to invasive procedures. If 1172 pregnant women were assigned an invasive procedure, there would be 2 - 3 pregnant women likely to have an abortion, because the rate of pregnancy loss due to invasive procedure is 0,11% - 0,22%. The sensitivity and accuracy of the NIPS test depend on cffDNA. cffDNA is directly proportional to the NIPS test sensitivity, so finding a method with high sensitivity and accuracy is essential. The study used the method of counting the number of DNA fragments in each chromosome (a method based on low-coverage DNA sequencing data from the pregnant woman's plasma - SeqFF). Results showed that cffDNA were bell-shaped and tended to increase with corresponding gestational age. cffDNA at gestational age from 10 to 20 weeks 6 days increased slightly statistically. cffDNA at gestational age ≥ 21 weeks increased significantly. The research results are similar to many studies in the world such as those of Zimmermann, Dar, Hudecova et al. The research results show that the average cffDNA level is 7,79%, lower than other studies, this may be explained by the large sample size studies and the difference in research designs. Using different sequencing methods and algorithms, the cffDNA levels obtained from the studies also varies. Many studies report no difference in cffDNA levels at gestational age from 10 to 22 weeks, cffDNA levels increase rapidly after 21 weeks. The study with the number of pregnant women ≥ 21 weeks accounting for a low rate of 4.79% (59/1231 samples) may be one reason leading to low cffDNA levels in the study. Next, there are a number of factors such as placenta mas, manipulation of plasma separation process, cell free DNA separation method and the chemicals used also significantly affect the concentration of cffDNA circulating in pregnant women's plasma. Research with the sample size is not large enough, can not represent the cffDNA levels of pregnant women, it is necessary to have studies with a larger sample size to be able to set the cffDNA levels threshold of pregnant women in Vietnam. The results found a statistically significant inverse correlation between the cffDNA and BMI of pregnant women, the results consistent with many studies in the world such as Ashoor, Revello, Scott et al. Increased BMI and obesity are correlated with an increased risk of NIPS failure results. Therefore, there are limitations in using the NIPS test in obese pregnant women. In the study, cffDNA levels were higher in pregnant women with trisomy 21 and trisomy 18 than in women with negative NIPS results from 10 weeks to 20 weeks 6 days, found differences statistical significance of cffDNA levels between 2 groups of pregnant women. Research by Ashoor et al (2013), Rava et al (2014) showed that cffDNA levels in gestational weeks from 11-13 weeks in case of trisomy 21 were statistically higher than the negative NIPS result. In the case of

trisomy 18, 13, the cffDNA levels was lower than the negative NIPS group. A study by Suzumori et al in 6,993 women with gestational age of 10 - 20 weeks also showed significantly lower cffDNA levels in trisomy 18, 13 than in the negative NIPS group. However, equivalent cffDNA levels in trisomy 21 and negative NIPS group. Meanwhile, Kinnings et al demonstrated that the effect of aneuploidy on cffDNA levels varies with gestational age. When comparing negative NIPS group, cffDNA levels increased from 16 weeks gestation to trisomy 21 samples. Similarly, cffDNA levels decreased from 21 weeks and 18 weeks, respectively, to trisomy 18 and 13. Therefore, the chromosome difference have different effects on cffDNA levels, depending on the affected chromosome. The study was limited in the number of trisomy 18 samples detected with gestational age from 10 to 20 weeks 6 days ($n = 7$), so the cffDNA concentration in trisomy 18 is higher than in the negative NIPS case. In the study, cffDNA levels was positively correlated with z-score, when cffDNA increased, z-score of trisomy 21, 18, 13 increased sharply while z-score of negative NIPS cases remained stable, the correlation was statistically significant. This result is also consistent with the study of Liao et al. The study showed a statistically inverse correlation between cffDNA levels and z-score in Turner syndrome (45,X). No statistically significant relationship was found between cffDNA levels and z-score for negative NIPS cases with trisomy 21, 18, 13 and sex chromosomal aneuploidies (SCAs). The research results are also consistent with the research of Xu-Ping Xu et al. At present, invasive prenatal diagnosis by amniocentesis is the gold standard for the diagnosis aneuploidy, which is the basis for comparing and evaluating the value of new techniques in prenatal screening and diagnosis. 59 NIPS positive cases using invasive procedures by amniocentesis, resulted in 08 cases (13,6%) with normal chromosomes (46,XX; 46,XY) and 51 trisomy 21, 18, 13 and SCAs cases (86,4%). The NIPS assay has an exceptionally high detection capacity and a lower rate of false positive than traditional prenatal screening tests (which have a false positive rate of 2 - 5%). However, the NIPS test still has a false positive result, possibly due to confined placental mosaicism (CPM), fetal mosaic, copy number variation (CNV), vanishing twins, maternal malignancy, true fetal mosaic (TFM) and even due to laboratory errors. The study found that 08 pregnant women had false-positive results for trisomy 18, 13 and SCAs and 01 pregnant women had false-negative results for SCAs. The rate of false positive NIPS results with trisomy 13 is relatively high (3/5), which may be related to the size of chromosome 13 or the GC content on chromosome 13. In addition, cffDNA and z-scores have a significant effect on the rate of false positive NIPS results. The research of Yuan et al showed that the NIPS test with z-score ≥ 9 was more accurate when the z-score was

within $3 \leq z\text{-score} < 5$ or $5 \leq z\text{-score} < 9$. False positive results for trisomy 18, 13 in the study had low cfDNA $\leq 8\%$ and z-score within $3 \leq z\text{-score} < 5$ in accordance with the guidelines of ACOG in 2015, which shows low cfDNA and z-scores as the main cause of NIPS false positive cases. The study found 03 false positive results with SCAs had z-score < -5 , 01 false negative case was 47,XYY: NIPS is positive with 47,XYY, when making definite diagnosis is 47,XYY, male fetus with high Y chromosome signal is 0,001043 (the male Y chromosome signal is $\geq 0,0003$). This result is also consistent with the study of Li et al, according to many studies, the chromosome type XXY and XYY are difficult to assess in the NIPS test. Therefore, with positive NIPS for chromosomal aneuploidies consented to invasive prenatal diagnosis. The study showed that the sensitivity and specificity of the NIPS test were 100% and 99,6% for trisomy 21, 18, 13 of which, the sensitivity and specificity for trisomy 21 were the highest equivalent to those in the world reports. The negative predictive value for all trisomy 21, 18 and 13 is 100% similar to the results of Sekelska et al in 2019, which showed that the negative predictive value for trisomy 21, 18, 13 is 99,99%. The highest positive predictive value in trisomy 21 detection is 100%, followed by trisomy 18 with 87%, the positive predictive value of trisomy 13 is relatively low with 40%, equivalent to the above studies in the world. This may be related to a significantly lower frequency of trisomy 13 compared to trisomy 21 and trisomy 18. Moreover, the number of trisomy 13 cases in each study was different and led to a positive predictive value of trisomy 13 different between studies. The study found that specificity and NPV with SCAs are 99,8% and 99,9%, the sensitive are 83,3%, PPV are 62,5%. The sensitive with 47,XYY is 0,0%. PPV for 47,XYY is the lowest accounting for 0,0%, followed by 45,X accounting for 50,0%, 47,XXY is 66,7%, the highest is trisomy X accounting for 100%. Research by Yao, Cheung and colleagues also have similar results, proving that the NIPS test more accurately predicts trisomy X and Klinefelter syndrome when compared with Turner syndrome. The study carried out with a low sample size, the cases of SCAs were detected only 9 cases, so the detection rates of NIPS was different from other studies. Most of the SCAs have no obvious clinical symptoms or ultrasound abnormalities, so the limitation of the study is that it is only possible to examine babies after birth and phones for women to determine the status of children without being able to accurately diagnose all cases of false negative SCAs. Research on 1231 samples showed PPV due to morphological abnormal ultrasound accounting for the highest proportion. In particular, pregnant women with ultrasound abnormalities combined NT $\geq 4\text{mm}$ with positive NIPS results accounted for the highest rate. A study by Beulen et al in 2017 suggests that NIPS test should not be

recommended for women with morphological abnormalities on ultrasound, because both the sensitivity or the negative predictive value are lower than the karyotype test. A positive NIPS result related to the high-risk pregnancy screening test shows that with a high risk of $\geq 1/10$, the rate of a positive NIPS test is the highest, resulting from study in accordance with the report of Persico et al in 2016. ISUOG recommends that is best not to advise on NIPS, but to recommend invasive procedures for CFTS cases at very high risk $\geq 1/10$ and nuchal translucency ≥ 4 mm. Research has shown some very significant results of the NIPS test for clinical practice, helping to reduce unnecessary invasive procedures. Traditional prenatal screening and ultrasound plays an important role in helping clinicians to recommend NIPS tests and invasive procedures suitable for each pregnant woman.

CONCLUSION

Based on the 2 objectives of the study, by applying the next generation sequencing technique to analyze cell free fetal DNA in pregnant woman's plasma, detect chromosomal aneuploidy of 21, 18, 13 and sex chromosome, the obtained research results allow to draw some conclusions as follows:

1. Application of the next generation sequencing technique to detect chromosomal aneuploidy of 21, 18, 13, X, Y chromosome with cell free fetal DNA in maternal blood.

- The rate of NIPS test failures is 1,44%, of which the cause is due to low cffDNA levels $< 3,5\%$, accounting for 1,36% and the reasons for failure sequences account for 0,08%.

- Research to optimize/complete the sequencing process: DNA library has attached barcodes diluted at 55pM concentration, loading up to 14 samples per 1 chip sequence.

- The rate of positive NIPS test by the next generation sequencing technique analyzing cffDNA is 4,79% (59 positive samples/1231 samples).

2. Initial evaluation of the value of the next generation sequencing technique using cell free fetal DNA in maternal blood.

- Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for trisomy 21, 18, 13 and sex chromosome detection are 99.8%; 99.3%; 86.2% and 99.9%.

- Trisomy 21, 18, 13: high sensitivity, specificity and negative predictive value for all 3 syndrome of Down, Edwards and Patau; the highest positive predictive value for Down syndrome (trisomy 21) is 100%, followed by Edwards syndrome (trisomy 18) is 87% and the lowest is Patau syndrome (trisomy 13) is 40%. The positive predictive value for all three syndromes is 90%.

- Sex chromosomal aneuploidies (X, Y): high specificity and negative predictive value for sex chromosomal aneuploidies, sensitivity of 0,0% for Jacob's syndrome (47,XYY), The lowest positive predictive value for Jacob's syndrome is 0,0%, followed by Turner syndrome (45,X) of 50,0%. The sensitivity and positive predictive value for detection of sex chromosomal aneuploidies are 83.3% and 62.5%.

- NIPS test by next generation sequencing technique to analyze cell free fetal DNA has high value to detect Down syndrome, Edwards syndrome, but lower for Patau syndrome, Jacob's syndrome and Turner syndrome.

SUGGESTIONS

- NIPS test should be advised for pregnant women who are at high risk of fetal chromosomal aneuploidies, which will help reduce the number of pregnant women who need to perform unnecessary invasive procedures and reduce the risk as well as the complications in pregnant women and fetus.

- The NIPS test is only a screening test, and women who have a positive NIPS result should be advised to have an invasive procedure.

- Suitable NIPS testing should be indicated to each pregnant woman based on traditional prenatal screening and ultrasound results.

From the results obtained, the research team made the following recommendations:

- Early NIPS testing should be advised for women from 10 weeks gestation at high risk of chromosomal aneuploidies.

- NIPS should be indicated appropriately for each pregnant woman based on traditional prenatal screening results and morphological ultrasound, NIPS testing should be restricted to obese women, should not be indicated NIPS test in women ≥ 45 years of age, women with very high risk of maternal serum screening results $\geq 1/10$, women with abnormal morphological ultrasound results and high nuchal translucency of $\geq 3,5$ mm.

- With positive NIPS test results, pregnant women are advised to perform invasive procedure to perform karyotype test.

- When NIPS test results are positive for sex chromosomal aneuploidies, it is advisable for pregnant women to get more blood karyotype tests.

- Specialist should consult before and after NIPS test for pregnant women on the advantages and limitations of NIPS test to detect chromosomal aneuploidy, especially Patau syndrome and sex chromosomal aneuploidy syndrome to avoid causing psychologically trauma for pregnant women when they receive positive NIPS test results, especially for Patau syndrome and sex chromosomal aneuploidies.

LIST OF PAPERS RELATED TO DISSERTATION

5. Hoang Hai Yen, Nguyen Duy Anh, Dinh Thuy Linh, Ta Thanh Van (2017). Evaluation of prenatal screening result to the detection of Down Syndrome from cell free fetal DNA in maternal plasma. *Viet Nam medicine magazine*, 458 (9), special number, 161-168.
6. Hoang Hai Yen, Nguyen Duy Anh, Dinh Thuy Linh, Ta Thanh Van (2018). Study to detect early Edwards Syndrome by noninvasive prenatal screening. *Practical medical journal*, 1066 (1), 52-54.
7. Hoang Hai Yen, Nguyen Duy Anh, Nguyen Minh Hien, Ta Thanh Van (2019). Value of cell free fetal DNA for non-invasive prenatal screening detection of fetal aneuploidy using semiconductor sequencing technology based on the seqff method. *Medical research journal*, 119(3), 23-32.
8. Hoang Hai Yen, Nguyen Duy Anh, Nguyen Minh Hien, Ta Thanh Van (2019). Initial evaluation on factors affecting levels of circulating cell free fetal DNA in maternal plasma. *Journal of obstetrics and gynecology*, 17(02), 11-17.