

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

GS.TS. Tạ Thành Văn

PGS.TS. Nguyễn Duy Ánh

HÀ NỘI - 2020

LỜI CẢM ƠN

Với tất cả lòng kính trọng, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các Thầy:

GS.TS. Tạ Thành Văn - Hiệu trưởng, Trưởng Bộ môn Hóa sinh Trường Đại học Y Hà Nội, người Thầy đã luôn tận tình chỉ bảo, truyền đạt những kiến thức và ý kiến quý báu, hướng dẫn và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận án.

PSG.TS. Nguyễn Duy Ánh - Giám đốc Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, Phó trưởng Bộ môn Phụ Sản Trường Đại học Y Hà Nội, người Thầy đã hết lòng hướng dẫn, chỉ dạy, động viên, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới:

Thầy, Cô Chủ tịch Hội đồng, các Thầy, các Cô trong Hội đồng chấm luận án đã có nhiều ý kiến quý báu giúp tôi hoàn thiện Luận án.

Đảng ủy, Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau đại học, Bộ môn Hóa sinh Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi để tôi hoàn thành luận án.

Đảng ủy, Ban Giám đốc, Phòng Kế hoạch tổng hợp, Trung tâm Đào tạo, Trung tâm Sàng lọc, Chẩn đoán trước sinh và sơ sinh Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới:

Các Thầy, các Cô, các anh, các chị tại Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội đã luôn giúp đỡ, tạo điều kiện cho tôi trong quá trình nghiên cứu.

Các anh, các chị, các bạn đồng nghiệp tại Trung tâm Sàng lọc, Chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội đã luôn hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu. Tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp đã luôn ủng hộ, động viên giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Ban Giám đốc, các anh, các chị, các bạn Công ty CP Thiết bị SISC Việt Nam đã luôn giúp đỡ, tạo điều kiện và hỗ trợ một phần kinh phí trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn tới tất cả các thai phụ đã tham gia trong nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận án và tiếp thêm động lực cho tôi để tiếp tục phấn đấu trong chuyên môn cũng như trong nghiên cứu khoa học.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến bố mẹ tôi, người đã sinh thành, nuôi dưỡng, yêu thương và tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập; chồng và hai con gái và những người thân trong gia đình đã luôn động viên, giúp đỡ và ở bên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành được luận án.

Hà Nội, ngày 10 tháng 4 năm 2020

Hoàng Hải Yến

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là **Hoàng Hải Yến**, nghiên cứu sinh khóa 34, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh Y học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Thầy: GS.TS. Tạ Thành Văn và PGS.TS. Nguyễn Duy Ánh.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày 10 tháng 04 năm 2020

Người viết cam đoan

Hoàng Hải Yến

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ACMG	The American College of <i>Medical Genetics</i> and <i>Genomics</i>	Hiệp hội gen và di truyền y học của Hoa Kỳ
ACOG	American College of <i>Obstetricians</i> and <i>Gynecologists</i>	Hội Thai phụ khoa Hoa Kỳ
AF	Amniotic fluid	Dịch ối
AMA	Advanced <i>Maternal Age</i>	Tuổi thai phụ cao (≥ 35 tuổi)
AQ	<i>Alignment Quality</i>	Chất lượng khớp
bp	<i>Base Pair</i>	Cặp base
cffDNA	<i>Cell Free Fetal DNA</i>	DNA thai tự do
CFTS	<i>Combined First Trimester Screening</i>	Sàng lọc kết hợp thai kỳ 1
CNV	<i>Copy Number Variation</i>	Biến thể số lượng bản sao
CSS	<i>Chromosome Selective Sequencing</i>	Giải trình tự nhiễm sắc thể chọn lọc (mục tiêu)
CPM	<i>Confined Placental Mosaicism</i>	Khảm giới hạn rau thai
CV	<i>Coefficient of Variation</i>	Điểm biến thiên
CVS	<i>Chorionic Villus Sampling</i>	Lấy mẫu gai rau
DANSR	<i>Digital Analysis of Selected Regions</i>	Phân tích số các vùng chọn lọc
DN	<i>Data Noise</i>	Dữ liệu nhiễu
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>	Acid nucleic
DTBS		Dị tật bẩm sinh
GC	<i>Guanine Cytosine</i>	
GRCh37	<i>Genome Reference Consortium human</i>	
HG	<i>Human Genome</i>	Hệ gen người
ISP	<i>Ion Sphere Particle</i>	
ISPD	<i>International Society for Prenatal Diagnosis</i>	Hiệp hội Chẩn đoán trước sinh quốc tế
ISUOG	The <i>International Society of Ultrasound in Obstetrics & Gynecology</i>	Hội Siêu âm thai phụ khoa Thế giới

MPSS	<i>Massively Parallel Shotgun Sequencing</i>	Giải trình tự đồng thời số lượng lớn ngẫu nhiên
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>	Giải trình tự gen thế hệ mới
NIPS	<i>Noninvasive Prenatal Screening</i>	Sàng lọc trước sinh không xâm lấn
NSGC	<i>National Society of Genetic Counselors</i>	Hội quốc gia về tư vấn di truyền
NST	<i>Chromosome</i>	Nhiễm sắc thể
NT	<i>Nuchal Translucency</i>	Độ mờ da gáy
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Phản ứng chuỗi trùng hợp
PPR	<i>Posteriori Risk</i>	Nguy cơ sau xét nghiệm
SCA	<i>Sex Chromosome Aneuploidy</i>	Lệch bội NST giới tính
SMFM	<i>Society for Maternal-Fetal Medicine</i>	Hội Y học thai phụ và thai
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>	Đa hình đơn nucleotide
TFM	<i>True Fetal Mosaicism</i>	Khảm thai thực sự
TMAP	<i>Torrent Mapping Alignment Program</i>	Thuật toán TMAP
URs	<i>Unique Reads</i>	Trình tự duy nhất

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Bất thường nhiễm sắc thể thai.....	3
1.1.1. Tần suất xuất hiện.....	3
1.1.2. Hậu quả của bất thường nhiễm sắc thể.....	4
1.1.3. Các bất thường NST thai thường gặp trong sàng lọc và chẩn đoán trước sinh	5
1.2. Tổng quan về một số xét nghiệm sàng lọc, chẩn đoán trước sinh phát hiện bất thường NST	10
1.2.1. Các xét nghiệm sàng lọc trước sinh truyền thống.....	10
1.2.2. Các phương pháp chẩn đoán trước sinh.....	14
1.3. Tổng quan về DNA thai tự do trong máu thai phụ	16
1.3.1. Lịch sử phát hiện DNA tự do trong máu thai phụ	16
1.3.2. Nguồn gốc DNA tự do trong huyết tương	17
1.3.3. Nguồn gốc và đặc điểm DNA thai tự do trong huyết tương.....	18
1.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến nồng độ cffDNA	18
1.3.5. Các phương pháp tiếp cận tin sinh học xác định nồng độ cffDNA ...	19
1.3.6. Ứng dụng lâm sàng của cffDNA trong huyết tương thai phụ	22
1.4. Giải trình tự gen thế hệ mới ứng dụng trong xét nghiệm NIPS.....	24
1.4.1. Nguyên lý giải trình tự thế hệ mới	24
1.4.2. Ứng dụng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới trong xét nghiệm NIPS.....	26
1.4.3. Nghiên cứu về DNA thai tự do tại Việt Nam.....	38
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.1. Đối tượng nghiên cứu	40

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn.....	40
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ	40
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	41
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	41
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu	41
2.2.3. Phương tiện nghiên cứu	42
2.2.4. Các chỉ tiêu nghiên cứu.....	43
2.2.5. Quy trình nghiên cứu	49
2.3. Sơ đồ nghiên cứu.....	53
2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	54
2.5. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu.....	54
2.6. Đạo đức trong nghiên cứu.....	55
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	56
3.1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu	56
3.1.1. Phân bố tuổi thai phụ trong nghiên cứu.....	56
3.1.2. Phân bố theo nghề nghiệp và địa dư	57
3.1.3. Đặc điểm cân nặng nhóm thai phụ làm xét nghiệm NIPS	57
3.2. 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.....	58
3.2.1. Chỉ định thai phụ làm xét nghiệm NIPS	58
3.2.2. Kết quả giải trình tự	59
3.3. Xác định tỷ lệ lệch bội NST 21, 18, 13, X, Y và đánh giá giá trị của phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới sử dụng DNA thai tự do trong huyết tương thai phụ.....	66
3.3.1. Kết quả xét nghiệm NIPS	66
3.3.2. Phân tích giá trị của nồng độ cffDNA trong xét nghiệm NIPS	68

3.3.3. Kết quả xét nghiệm karyotype từ dịch ối trên mẫu có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính	73
3.3.4. Các trường hợp kết quả xét nghiệm NIPS không phù hợp với kết quả xét nghiệm karyotype	79
3.3.5. Giá trị của xét nghiệm NIPS trong sàng lọc lệch bội NST thai....	80
3.3.6. Kết quả nghiên cứu	84
3.3.7. Đánh giá kết quả xét nghiệm NIPS dựa trên yếu tố nguy cơ.....	85
Chương 4: BÀN LUẬN	90
KẾT LUẬN	129
KIẾN NGHỊ	131
NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA NGHIÊN CỨU	
DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ	
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Tỷ lệ phát hiện và tỷ lệ dương tính giả xét nghiệm sàng lọc huyết thanh thai phụ phát hiện trisomy 21	13
Bảng 1.2.	Kết quả phát hiện trisomy 21 theo tuổi thai phụ và nguy cơ*	31
Bảng 1.3.	Kết quả phát hiện trisomy 18, 13*	32
Bảng 1.4.	So sánh các phương pháp sàng lọc	33
Bảng 1.5.	Kết quả sàng lọc trisomy 21, 18, 13	34
Bảng 2.1.	Đánh giá kết quả xét nghiệm NIPS	54
Bảng 3.1.	Đặc điểm tuổi thai phụ trong nghiên cứu	56
Bảng 3.2.	Đặc điểm cân nặng nhóm thai phụ làm xét nghiệm NIPS.....	57
Bảng 3.3.	Tuổi thai tại thời điểm làm xét nghiệm NIPS.....	58
Bảng 3.4.	Yếu tố nguy cơ của thai phụ làm xét nghiệm NIPS	58
Bảng 3.5.	Nồng độ DNA tự do và nồng độ DNA thư viện.....	59
Bảng 3.6.	Kết quả chất lượng ISP trên chip giải trình tự.....	61
Bảng 3.7.	Chất lượng khớp của đoạn đọc với trình tự hg19.....	63
Bảng 3.8.	Tỷ lệ thành công của xét nghiệm NIPS	63
Bảng 3.9.	Tỷ lệ thất bại của của xét nghiệm NIPS	64
Bảng 3.10.	Kết quả giải trình tự.....	64
Bảng 3.11.	Kết quả điểm z-score NST 21, 18, 13, X.....	66
Bảng 3.12.	Tỷ lệ lệch bội NST trong xét nghiệm NIPS	66
Bảng 3.13.	Phân loại lệch bội NST với xét nghiệm NIPS dương tính	67
Bảng 3.14.	Nồng độ cffDNA và tuổi thai	68
Bảng 3.15.	Nồng độ cffDNA và cân nặng thai phụ	69
Bảng 3.16.	Kết quả xét nghiệm karyotype từ dịch ối	74
Bảng 3.17.	Các trường hợp kết quả xét nghiệm NIPS không phù hợp với kết quả xét nghiệm karyotype	79
Bảng 3.18.	Xét nghiệm NIPS dương tính với trisomy 21, 18, 13.....	80

Bảng 3.19.	Xét nghiệm NIPS dương tính với lệch bội NST giới tính.....	81
Bảng 3.20.	Giá trị xét nghiệm NIPS	83
Bảng 3.21.	Giá trị tiên đoán dương dựa vào yếu tố nguy cơ	85
Bảng 3.22.	Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến tuổi thai phụ	86
Bảng 3.23.	Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến sàng lọc huyết thanh thai phụ nguy cơ cao trisomy 21.....	87
Bảng 3.24.	Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến siêu âm bất thường.....	87
Bảng 3.25.	Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến độ mờ da gáy.....	88
Bảng 3.26.	Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến các yếu tố nguy cơ	89
Bảng 4.1.	Nồng độ cfDNA qua các nghiên cứu trên thế giới.....	103

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1.	Phân bố theo nghề nghiệp và địa dư	57
Biểu đồ 3.2.	Phân bố z-score NST 21.....	65
Biểu đồ 3.3.	Phân bố z-score NST 18.....	65
Biểu đồ 3.4.	Phân bố z-score NST 13.....	65
Biểu đồ 3.5.	Phân bố z-score NST X.....	65
Biểu đồ 3.6.	Phân bố nồng độ cffDNA.....	68
Biểu đồ 3.7.	Nồng độ cffDNA và tuổi thai.....	69
Biểu đồ 3.8 - 3.9.	Nồng độ cffDNA và cân nặng, BMI.....	70
Biểu đồ 3.10.	Nồng độ cffDNA và tuổi thai phụ.....	70
Biểu đồ 3.11.	Nồng độ cffDNA và z-score NST 21.....	71
Biểu đồ 3.12.	Nồng độ cffDNA và z-score NST 18.....	71
Biểu đồ 3.13.	Nồng độ cffDNA và z-score NST 13.....	72
Biểu đồ 3.14.	Nồng độ cffDNA và z-score NST X.....	72
Biểu đồ 3.15.	Nồng độ cffDNA và trisomy 18, 21.....	73

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu	53
Sơ đồ 3.1. Sơ đồ kết quả nghiên cứu	84

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Tỉ lệ bất thường các NST được chẩn đoán khi trẻ < 1 tuổi	4
Hình 1.2.	Trẻ mắc hội chứng Down (Trisomy 21)	5
Hình 1.3.	Trẻ mắc hội chứng Edwards	6
Hình 1.4.	Trẻ mắc hội chứng Patau	7
Hình 1.5.	Trẻ mắc hội chứng Turner	8
Hình 1.6.	Kỹ thuật hút dịch ối và lấy mẫu gai rai.....	14
Hình 1.7.	Cơ chế giải phóng DNA tự do	17
Hình 1.8.	DNA thai tự do trong máu thai phụ	18
Hình 1.9.	Các cách tiếp cận để xác định nồng độ cffDNA.....	21
Hình 1.10.	Giải trình tự tổng hợp.....	25
Hình 1.11.	Giải trình tự bán dẫn	26
Hình 1.12.	Các phương pháp sử dụng trong sàng lọc DNA thai tự do.....	28
Hình 1.13.	Biểu đồ khám NST.....	35
Hình 1.14.	Các trường hợp dương tính giả của xét nghiệm NIPS.....	36
Hình 2.1.	Biểu đồ phân bố chuẩn của điểm z-score	48
Hình 2.2.	Quy trình tạo DNA thư viện	50
Hình 2.3.	Các bước chính chuẩn bị mẫu DNA thư viện trên Ion Chef	51
Hình 2.4.	Giải trình tự trên máy Proton.....	51
Hình 3.1.	Kết quả kiểm tra chất lượng DNA thư viện.....	60
Hình 3.2.	Hiệu quả nạp mẫu vào chip giải trình tự.....	61
Hình 3.3.	Chất lượng khớp của đoạn đọc với trình tự hg19.....	62
Hình 3.4.	Kết quả phân tích NST từ dịch ối thai phụ L.T.T.T.	76
Hình 3.5.	Kết quả phân tích NST từ dịch ối thai phụ N.T.N.L.	77
Hình 3.6.	Kết quả phân tích NST từ dịch ối thai phụ N.T.T.	78
Hình 4.1.	Giải trình tự thất bại.....	95

ĐẶT VẤN ĐỀ

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 [1],[2]. Chiếm khoảng 83,0% 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... [3].

Các phương pháp sàng lọc trước sinh truyền thống phát hiện lệch bội NST bao gồm siêu âm hình thái và phân tích huyết thanh thai phụ trong thai kỳ 1 và thai kỳ 2. Tỷ lệ phát hiện trisomy 21 với ngưỡng lớn hơn 1/250 dao động từ 50% đến 95% với tỷ lệ dương tính giả khoảng 5,0% tùy thuộc vào phương pháp sàng lọc được sử dụng [4]. Để chẩn đoán xác định thì các thai phụ có nguy cơ cao bất thường NST 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, Prenatal BoBs, MLPA. Các thủ thuật xâm lấn này có thể gây mất thai với tỷ lệ là 0,11 - 0,22% [5]. Do đó, rất cần có những phương pháp sàng lọc 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 [6].

Gần đây, xét nghiệm phân tích DNA thai tự do (cell free fetal DNA - cffDNA) sàng lọc lệch bội NST sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing - NGS) đã được chứng minh là phương pháp sàng lọc trước sinh hiệu quả so với các phương pháp sàng lọc trước sinh truyền thống với tỷ lệ phát hiện trisomy 21 là 99,2% và tỷ lệ dương tính giả là 0,09%, tỷ lệ phát hiện trisomy 18 là 96,3% và tỷ lệ dương tính giả là 0,13%, tỷ lệ phát hiện trisomy 13 là 91,0% và tỷ lệ dương tính giả là 0,13%

[7],[8],[9]. Với mong muốn tìm hiểu rõ hơn về giá trị của phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới, giúp thầy thuốc lâm sàng có thêm một phương pháp sàng lọc lệch bội NST thai, đề tài **“Nghiên cứu giá trị của phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới phát hiện lệch bội nhiễm sắc thể thai bằng DNA thai tự do trong máu mẹ”** được tiến hành với 2 mục tiêu:

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.*

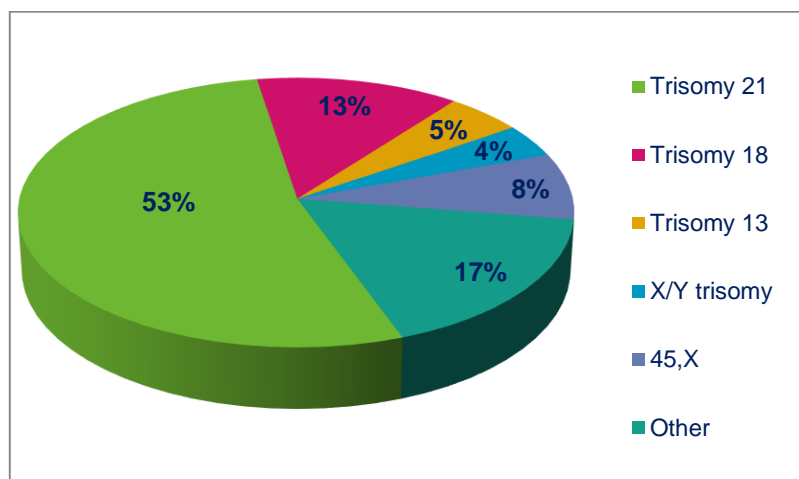
Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Bất thường nhiễm sắc thể thai

1.1.1. Tần suất xuất hiện

Các nhiễm sắc thể (NST) có thể bị bất thường về số lượng hoặc cấu trúc. Các biến đổi này có thể thấy ngay khi sinh hoặc mắc phải trong quá trình ác tính hoá của các tế bào khối u và là kết quả của các biến cố xảy ra trong phân bào giảm nhiễm hoặc phân bào nguyên nhiễm. Sự bất thường này có thể xảy ra trên một hoặc nhiều NST. Bất thường NST phổ biến nhất là trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính [10]. Nghiên cứu trên 34.910 trẻ sinh sống đến 13 tuổi tại Đan Mạch cho thấy bất thường NST chiếm khoảng 15,0% các dị tật bẩm sinh được chẩn đoán trước 1 tuổi và 25,0% tử vong chu sinh do dị tật bẩm sinh, tần suất bất thường NST là 1/118 hay 8,45/10.000 trẻ sinh sống [11]. Nghiên cứu tại cộng đồng các nước ở Châu Âu năm 2004 cũng cho thấy khoảng 1/4 trường hợp tử vong sớm ở trẻ sơ sinh là do dị tật bẩm sinh, trong đó 18,0% do bất thường NST. Trong nghiên cứu trên 10.323 trường hợp bất thường NST bao gồm các trường hợp sinh con sống trước 1 tuổi, thai chết khi tuổi thai trên 20 tuần hoặc đình chỉ thai nghén vì dị tật bẩm sinh từ năm 2000 - 2006. Kết quả phát hiện 7.335 trường hợp trisomy 21, 18 hoặc 13, trong đó trisomy 21 chiếm tỷ lệ 53,0% với tần suất xuất hiện là 23/10.000, trisomy 18 chiếm tỷ lệ 13,0% với tần suất 5,9/10.000, trisomy 13 chiếm tỷ lệ 5% với tần suất 2,3/10.000, trisomy NST giới tính là 473 ca chiếm tỷ lệ 5% với tần suất 2/10.000 và 778 ca monosomy X chiếm tỷ lệ 8,0% với tần suất 3,3/10.000. Chỉ có 1.737 ca bất thường NST hiếm gặp chiếm tỷ lệ 17,0% với tần suất là 7,4/10.000 bao gồm thể tam bội, trisomy các NST khác, chuyển đoạn NST không cân bằng, mất đoạn và nhân đoạn (Hình 1.1) [3].



Hình 1.1. Tỷ lệ bất thường các NST được chẩn đoán khi trẻ < 1 tuổi

(Nguồn: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3330224>)

Tại Trung Quốc, mỗi năm có khoảng 16 triệu trẻ mới sinh, trong đó dị tật bẩm sinh chiếm khoảng 4,0 - 6,0%. Bất thường NST chiếm tỷ lệ 1/160 trẻ sinh sống tại Mỹ và 1/60 tại Trung Quốc [10],[12]. 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. Theo báo cáo của Phùng Như Toàn (2003) từ kết quả nuôi cấy từ dịch ối phát hiện 24/213 ca bất thường NST chiếm 11,2% [13]. Hoàng Thị Ngọc Lan và cộng sự (2004) phát hiện 7/40 ca bất thường số lượng NST chiếm tỷ lệ 17,5% [14], Trần Danh Cường (2005) phát hiện 11/95 ca bất thường NST chiếm tỷ lệ 11,6%, trong đó trisomy 21 chiếm 50,79% [15].

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 50,0% trường hợp sảy thai tự nhiên trong ba tháng đầu hoặc chết trước khi sinh [16]. Tần suất bất thường NST thường gặp từ 1/150 - 1/200 trẻ sinh sống. Khoảng 3,0 - 4,0% 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. Điều tra ở các quần thể trưởng thành khỏe mạnh cho thấy tần số bất thường NST thấp hơn [16]. Do đó, việc phát triển các phương pháp sàng lọc, chẩn đoán trước sinh là thực sự cần thiết.

1.1.3. Các bất thường NST thai thường gặp trong sàng lọc và chẩn đoán trước sinh

1.1.3.1. Hội chứng Down hay 3 NST 21 (trisomy 21)

Hội chứng Down (47,XX,+21; 47,XY,+21) là bất thường bẩm sinh thường gặp nhất trong các bất thường NST, chiếm khoảng 1/700 trẻ sinh sống, tỷ lệ bệnh theo giới là 3 nam/2 nữ. Theo Zoltán Papp 95,0% hội chứng Down là đột biến số lượng NST 21 dạng thuần; 4,0% do chuyển đoạn; 1,0% là thể khảm [17].



Hình 1.2. Trẻ mắc hội chứng Down (Trisomy 21)

(Nguồn: Khoa sơ sinh, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội)

Hội chứng Down có tỷ lệ tử vong cao, khoảng 20,0% trẻ mắc hội chứng Down sinh ra chết trước 5 tuổi, 44,0% số trẻ còn lại có thể sống tới tuổi 60. Trẻ mắc hội chứng Down với dấu hiệu điển hình: trán thấp, mắt xếch, gáy rộng và dẹt, sống mũi tẹt, môi trề, nếp ngang đơn độc ở lòng bàn tay, các đốm trắng nhỏ ở móng mắt..., dị tật ở tim chiếm 46,0%, bất thường ống tiêu hoá chiếm 7,0%, 10,0% mắc động kinh ở tuổi 50. Người mắc hội chứng Down luôn kèm theo

chậm phát triển trí tuệ một cách trầm trọng ảnh hưởng lớn đến khả năng hoà nhập cộng đồng. Các gia đình có người mắc hội chứng Down có một gánh nặng lớn về tâm lý cũng như tài chính, gánh nặng cho sự phục vụ và chăm sóc y tế của xã hội [17].

1.1.3.2. Hội chứng Edwards hay 3 NST 18 (trisomy 18)

Hội chứng Edwards (47,XX,+18; 47,XY,+18) lần đầu tiên được một nhóm các nhà di truyền học người Anh đứng đầu là Edwards mô tả đầy đủ năm 1960 [18]. Bệnh xuất hiện với tần suất 1:5.000 trẻ sinh sống. Đây là hội chứng bất thường NST đứng thứ 2 sau hội chứng Down.



Hình 1.3. Trẻ mắc hội chứng Edwards

(Nguồn: Khoa sơ sinh, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội)

Trẻ mắc hội chứng Edwards có bộ mặt bất thường (đầu nhỏ, các khe mắt hẹp và ngắn, hàm dưới và lỗ miệng bé, cằm nhỏ, vành tai bị biến dạng, tai ở vị trí thấp), các tật ở chi trên là sự xếp lộn xộn của xương bàn, bất thường khớp giữa ngón I (bàn tay co quắp), bất thường ở bàn chân (lòng bàn chân dày) và khe hở môi [18]. Do có nhiều dị tật ở nhiều cơ quan, nên trẻ mắc hội chứng Edwards thường tử vong sớm. Khoảng 60,0% các trường hợp tử vong trước 3 tháng, 30,0% tử vong trước 1 tháng, 1/10 trẻ mắc bệnh sống được đến 1 tuổi [18].

1.1.3.3. Hội chứng Patau hay 3 NST 13 (trisomy 13)

Hội chứng Patau (47,XX,+13; 47,XY,+13) lần đầu tiên được Patau và cộng sự mô tả năm 1960. Bệnh gặp với tần suất 1:5.000 đến 1:100.000 trẻ sống. Tỷ lệ bệnh gặp ở nữ nhiều hơn nam. Các trẻ mắc hội chứng Patau có trọng lượng khi sinh thấp hơn mức trung bình khoảng 900g và thường sinh thiếu tháng. Các dấu hiệu lâm sàng bên ngoài của hội chứng này rất điển hình thường đặc trưng biểu hiện ở sọ và mặt: đầu nhỏ, trán ngắn, khe mắt hẹp, góc mũi rộng, tai mọc thấp với vành tai biến dạng, khoảng cách giữa hai mắt giảm, da đầu thường bị loét, có u mạch máu ở vùng đầu và cằm [17],[19].



Hình 1.4. Trẻ mắc hội chứng Patau

(Nguồn: John Nilcholl, MD, Hong Kong University)

Một trong những dấu hiệu điển hình nhất của hội chứng Patau là khe hở môi trên và vòm miệng ở cả hai phía, tật nhiều ngón ở chi. Các dị tật bẩm sinh ở tim chiếm 80,0% trường hợp, hệ thống bài tiết > 60,0%, hệ thống cơ quan sinh sản chiếm 75,0%. Do có quá nhiều dị tật nặng nề, nên những trẻ mắc hội chứng Patau thường tử vong trong năm đầu (90,0%), trong đó 40,0% là chết chu sinh [17],[19].

1.1.3.4. Các bất thường NST giới tính (X, Y)

Hội chứng Turner hay monosomy X (45,X)

Hội chứng Turner (TS) là bệnh lý rối loạn NST giới tính phổ biến nhất, gây ra một loạt các bất thường kiểu hình ở người nữ. Các bất thường này là

hậu quả thiếu hụt gen của cặp NST giới tính do thiếu hoàn toàn hoặc một phần NST giới tính X. Tần suất mắc TS vào khoảng 1/3.000 trẻ sơ sinh gái. Tùy thuộc vào số lượng gen thiếu hụt mà biểu hiện của TS rất đa dạng. Trẻ mắc TS thường có cổ to bè, thừa da gáy, tóc mọc ở vị trí thấp, phù mu lòng bàn chân, hàm dưới nhỏ. Người mắc TS thường thiếu năng sinh dục, giới tính thứ cấp không phát triển, vô sinh, rối loạn nội tiết gây chậm phát triển về thể chất, đôi khi chậm phát triển về trí tuệ. Các dị tật tim, thận là nguyên nhân gây tử vong sớm của các bệnh nhân TS. Để hạn chế các biểu hiện bất thường của TS cần theo một chế độ điều trị đặc biệt, lâu dài từ giai đoạn sớm và cũng chỉ hạn chế được một phần các biểu hiện của bệnh [17].



Hình 1.5. Trẻ mắc hội chứng Turner

(Nguồn: Khoa sơ sinh, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội)

Hội chứng Klinefelter (47,XXY)

Hội chứng Klinefelter hay gặp nhất ở nam giới với tần suất 1:500 đến 1:10.000 lần trẻ sơ sinh nam, 80% người Klinefelter với kiểu nhiễm sắc thể 47,XXY; Một số thể khảm 47,XXY/46,XY; 45,X/46,XY/47,XXY... Số lượng và mức độ của các triệu chứng phụ thuộc vào số lượng và vị trí của các mô tế bào có thêm NST X. Biểu hiện lâm sàng của hội chứng Klinefelter thường không đặc hiệu trong thời kỳ trẻ nhỏ. Ở giai đoạn dậy thì thường tinh hoàn

không phát triển, mào tinh hoàn đôi khi lớn hơn tinh hoàn, tinh hoàn teo nhỏ, dáng người giống nữ, chứng vú to, thường vô sinh do vô tinh và thiếu tinh. Người mắc hội chứng Klinefelter bị thiếu tinh có thể có con nhưng cần hỗ trợ sinh sản. Một số trường hợp có thể lấy tinh trùng từ tinh hoàn để làm kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương trứng [17].

Hội chứng Jacobs (47,XYY)

Tần suất hội chứng Jacobs (47,XYY) là 1/10.000 nam giới. Nam giới XYY thường được phát hiện trong các chương trình sàng lọc sơ sinh. 75% người 47,XYY có kiểu hình bình thường với tầm vóc cao lớn ở tuổi thanh thiếu niên. Khả năng sinh sản thường là bình thường. 50% trẻ mắc hội chứng Jacob cần có sự can thiệp giáo dục do sự chậm phát triển ngôn ngữ, đọc và đánh vần khó khăn. Chỉ số IQ của họ thấp hơn trung bình khoảng 10 - 15 điểm. Người 47,XYY không có kiểu hình hành vi nhất quán, một số nghiên cứu báo cáo có sự gia tăng cơn giận dữ và mất tập trung ở người mắc hội chứng Jacob. Tuy nhiên, hành vi gây gổ hoặc quá khích không thường xuyên quan sát được ở trẻ em và thanh thiếu niên. Phần lớn người 47,XYY có cuộc sống như những người bình thường [17].

Trisomy X (47,XXX)

Trisomy X xảy ra với tỷ lệ 1/10.000 trẻ gái. Trẻ mắc trisomy X, mặc dù có tầm vóc trung bình, nhưng không có kiểu hình bất thường, do vậy hầu hết các trường hợp không được chẩn đoán. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng người trisomy X có khả năng sinh sản bình thường mặc dù có tăng nguy cơ sinh con bất thường NST. Chỉ số IQ giảm đáng kể và khoảng 70,0% có một số vấn đề về học tập ở người trisomy X [17].

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

1.2.1.1. Tuổi thai phụ

Nguy cơ bất thường NST tăng theo tuổi thai phụ và giảm theo tuổi thai. Tỷ lệ thai 12 tuần mắc trisomy 21 là 30,0% và thai 16 tuần là 20,0% [19].

Trong những năm 1970, theo thống kê, phụ nữ ≥ 35 tuổi chiếm 5,0%, khoảng 30,0% mang thai mắc trisomy 21. Do vậy, 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 chiếm 50,0% [4]. Nguyên nhân do tuổi thai phụ càng cao thì trứng càng chịu nhiều tác động từ bên trong cũng như bên ngoài, dẫn đến tăng nguy cơ bất thường NST.

1.2.1.2. Ảnh hưởng của lần mang thai trước đó

Nguy cơ thai mắc trisomy cao hơn trên những thai phụ có tiền sử mang thai trisomy so với nguy cơ theo tuổi thai phụ. Thai phụ có tiền sử mang thai trisomy 21, nguy cơ tái mắc cho lần mang thai sau là 0,75%, cao hơn nguy cơ theo tuổi thai phụ ở cùng thời điểm mang thai. Do vậy, một thai phụ 35 tuổi có tiền sử mang thai trisomy 21 nguy cơ tăng từ 1:249 (0,4%) đến 1:87 (1,15%) tại 12 tuần thai, và thai phụ 25 tuổi nguy cơ tăng từ 1:946 (0,11%) đến 1:117 (0,86%). Thai phụ có tiền sử mang thai trisomy 18, nguy cơ tái mắc cho lần mang thai sau là 0,75%, cao hơn nguy cơ theo tuổi thai phụ và tuổi thai liên quan tới nguy cơ trisomy 18; nguy cơ trisomy 21 những phụ nữ này không tăng thêm. Do vậy, nguy cơ tái mắc trisomy là đặc hiệu cho bất thường NST [4].

1.2.1.3. Siêu âm thai

Thông qua các hình ảnh bất thường về hình thái của thai trên siêu âm 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 [20]. Đầu những năm 1990, liên quan giữa tăng NT và thai bất thường NST đã được ghi nhận, tỷ lệ bất thường NST từ 19,0 - 88,0% tương ứng với NT từ 2 - 10mm. NT có giá trị tiên đoán nguy cơ bất thường NST với độ nhạy trên 80,0%, tỷ lệ dương tính giả là 4,5% [21], NT > 3mm gặp ở 90,0% thai nhi mắc trisomy 13 hoặc 18,80% thai mắc trisomy 21 và 5,0% thai bình thường. Nguy cơ bất thường NST tăng gấp 3 lần khi NT là 3mm. Nguy cơ này tăng 18 lần khi NT là 4mm và gấp 28 lần khi NT là 5mm.

Việc phân tích sự có mặt của xương mũi, nhịp tim thai, doppler ống tĩnh mạch, doppler van ba lá thai nhi bằng siêu âm cũng được sử dụng trong thai kỳ 1 nhằm tăng tỷ lệ phát hiện hội chứng Down. Từ 11 - 14 tuần, khoảng 60,0 - 70,0% thai trisomy 21 không thể siêu âm được xương mũi và dưới 1% thai có số lượng NST bình thường không siêu âm được xương mũi [22].

1.2.1.4. Sàng lọc trước sinh bằng xét nghiệm hóa sinh

Thuật toán tính nguy cơ cho thai phụ

Để tính toán nguy cơ cho thai phụ, cần phải tính nguy cơ mắc bệnh (tuổi thai phụ và tuổi thai) kết hợp với siêu âm và xét nghiệm hóa sinh trong huyết thanh thai phụ, sau đó sử dụng các thuật toán tính nguy cơ mắc bệnh thực sự của thai. Thai phụ có nguy cơ $\geq 1/250$ được xem là “nguy cơ cao” hoặc “sàng lọc dương tính”, nguy cơ $< 1/10.000$ được xem là “nguy cơ thấp” hoặc “sàng lọc âm tính”. Phụ thuộc vào chiến lược sàng lọc của từng nước, những thai phụ có nguy cơ trung bình từ $1/251$ đến $1/10.000$ trong sàng lọc kết hợp thai kỳ 1 có thể sẽ sàng lọc thêm giai đoạn 2 và sử dụng thuật toán điều chỉnh lại nguy cơ từ thai kỳ 1 [23]. Tính toán nguy cơ cho thai phụ

thường sử dụng thuật toán từ phần mềm FMF (UK) trong sàng lọc thai kỳ 1 và phần mềm Prisca (Immulite), T21 (Gamma) và Life cycle (Perkin Elmer) trong sàng lọc thai kỳ 2.

Sàng lọc thai kỳ 1 (11 - 14 tuần)

Sàng lọc kết hợp thai kỳ 1 (Combined first trimester screening - CFTS) thực hiện từ 11 - 14 tuần thai dựa trên tuổi thai phụ, tiền sử trisomy, siêu âm đo NT 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. Đây là xét nghiệm sàng lọc trước sinh chuẩn đang được sử dụng ở phần lớn các nước đang phát triển. Phương pháp này có tỷ lệ phát hiện trisomy 21 tới 90,0% với tỷ lệ dương tính giả 5,0% [23].

Sàng lọc thai kỳ 2 (15 - 22 tuần)

Triple test: Tuổi thai phụ + AFP + hCG + uE3

Quadruple test (Quad test): Tuổi thai phụ + AFP + β hCG + uE3 + Inhibin A

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. Sàng lọc triple test có tỷ lệ phát hiện trisomy 21 là 60 - 70% với tỷ lệ dương tính giả là 5%, sàng lọc Quadruple test có tỷ lệ phát hiện cao hơn là 81% với tỷ lệ dương tính giả là 5% [4].

Sàng lọc kết hợp thai kỳ 1 và thai kỳ 2

Sàng lọc tích hợp (Intergrated screening) dựa vào siêu âm đo NT, định lượng PAPP-A kết hợp với quad test có tỷ lệ phát hiện khoảng 96,0% và tỷ lệ dương tính giả là 5,0%. Tuy nhiên, sàng lọc tích hợp phức tạp, yêu cầu đánh giá siêu âm thai kỳ 1, xét nghiệm hóa sinh 2 lần và kết quả cuối cùng đưa ra vào thai kỳ 2. Giống như sàng lọc tích hợp, sàng lọc tuần tự (Sequential screening) và sàng lọc phân nhóm (Contingent screening) đều dựa vào sàng

lọc thai kỳ 1 và 2 để đưa ra kết quả cuối cùng. Tuy nhiên, kết quả sàng lọc thai kỳ 1 sẽ được trả lại cho bệnh nhân. Sàng lọc tuần tự thực hiện sàng lọc thai kỳ 1 kết hợp quad test. Bệnh nhân nguy cơ cao sẽ được tư vấn xét nghiệm chẩn đoán xâm lấn sớm từ thai kỳ 1. Sàng lọc phân nhóm thực hiện sàng lọc thai kỳ 1 cho tất cả thai phụ, sau đó phân loại nguy cơ cao, nguy cơ trung bình và nguy cơ thấp. Nhóm nguy cơ cao sẽ được tư vấn xét nghiệm chẩn đoán xâm lấn, nhóm nguy cơ thấp sẽ không phải xét nghiệm thêm, nhóm nguy cơ trung bình được tiếp tục xét nghiệm quad test thai kỳ 2. Tỷ lệ phát hiện trisomy 21 từ 88,0 - 94,0% với tỷ lệ dương tính giả là 5,0% (bảng 1.1) [24].

Bảng 1.1. Tỷ lệ phát hiện và tỷ lệ dương tính giả xét nghiệm sàng lọc huyết thanh thai phụ phát hiện trisomy 21

Phương pháp sàng lọc	Tuổi thai (tuần)	DR (%)	FPR (%)	XN sàng lọc
CFTS	11 - 14	82,0 - 87,0	5,0	NT+PAPP-A và hCG, TM
Triple test	15 - 22	69,0	5,0	hCG, AFP, uE3, TM
Quad test	15 - 22	81,0	5,0	hCG, AFP, uE3, InhibinA, TM
Sàng lọc tích hợp	11 - 14, sau đó 15 - 22	96,0	5,0	NT + PAPP-A, sau đó Quad test
Sàng lọc tuần tự	11 - 14	95,0	5,0	NT + hCG + PAPP-A, sau đó Quad test
Sàng lọc phân nhóm	sau đó 15 - 22	88,0 - 94,0	5,0	NT + hCG + PAPP-A, sau đó Quad test
Sàng lọc tích hợp	11 - 14 sau đó 15 - 22	88,0	5,0	PAPP-A + Quad
NT	11 - 14	64,0 - 70,0	5,0	Siêu âm
cffDNA	> 9	99,0	0,5	cffDNA

Ghi chú: CFTS: Sàng lọc kết hợp thai kỳ 1 (Combined first trimester screening); TM: tuổi thai phụ, NT: độ mờ da gáy; DR: tỷ lệ phát hiện; FPR: tỷ lệ dương tính giả.

Như vậy trong các xét nghiệm sàng lọc trước sinh bằng huyết thanh thai phụ kết hợp với siêu âm và một số yếu tố nguy cơ có thể tăng tỷ lệ phát hiện lên đến 96,0% nhưng tỷ lệ dương tính giả vẫn khá cao là 5,0% [22]. Do vậy vẫn cần một phương pháp sàng lọc có tỷ lệ phát hiện cao hơn với tỷ lệ dương tính giả thấp hơn nữa để có thể giảm bớt các thủ thuật xâm lấn không cần thiết, có thể gây ảnh hưởng tới thai phụ và thai nhi [6].

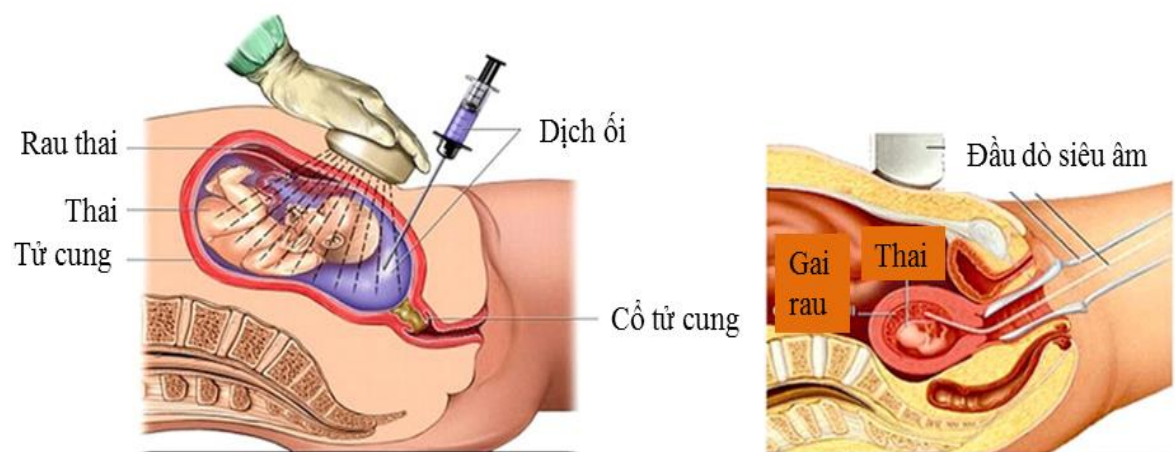
1.2.2. Các phương pháp chẩn đoán trước sinh

1.2.2.1. Các phương pháp lấy mẫu trong chẩn đoán trước sinh

Phương pháp lấy mẫu xâm lấn

Phương pháp lấy mẫu này ảnh hưởng trực tiếp đến thai và có thể gây tai biến cho thai cũng như cho thai phụ (mất thai, rỉ ối,...). Để giảm bớt rủi ro, việc sàng lọc trước sinh không xâm lấn những thai phụ có nguy cơ cao mang thai bất thường NST sẽ giảm đáng kể số thai phụ phải thực hiện xét nghiệm này.

* **Hút dịch ối:** được thực hiện khi thai từ 16 tuần. Dịch ối có các loại tế bào ối, da, phổi và tế bào biểu bì đường tiết niệu của thai. Tỷ lệ mất thai do thủ thuật hút dịch ối khoảng 0,11% [5].



Hình 1.6. Kỹ thuật hút dịch ối và lấy mẫu gai rai

(Nguồn: <https://www.h3u.com/blogs/post/prenatal-tests-at-which-trimester>)

* **Lấy mẫu gai rau** (Chorionic Villus Sampling - CVS):

Kỹ thuật CVS được thực hiện đầu tiên vào những năm 1960. Kỹ thuật CVS thường thực hiện từ 11 - 14 tuần thai qua thành bụng, cũng có thể qua đường âm đạo tùy theo vị trí bánh rau. Ưu điểm của CVS là kết quả thu được ở tuổi thai sớm hơn so với hút dịch ối. Hạn chế của CVS là tỷ lệ mất thai cao hơn hút dịch ối [5].

Phương pháp lấy mẫu không xâm lấn

Hiện nay, các nhà khoa học đang quan tâm đến phương pháp lấy mẫu không xâm lấn giúp thai phụ tránh được nguy cơ mất thai do thực hiện thủ thuật xâm lấn. Mẫu máu thai phụ có thể sử dụng để phân tích tế bào thai hoặc phân tích DNA thai tự do.

1.2.2.2. Các kỹ thuật di truyền được áp dụng để chẩn đoán trước sinh

Kỹ thuật phân tích bộ NST lập karyotype

Phân tích số lượng và cấu trúc NST dựa trên bộ NST của tế bào ở kỳ giữa (metaphase) hoặc tiền kỳ giữa (pro-metaphase) để lập karyotype. Kỹ thuật được sử dụng phổ biến là kỹ thuật nhuộm băng G và được coi là một trong những phương pháp phân tích di truyền tế bào học truyền thống [25].

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (Fluorescent in situ hybridization - FISH)

Kỹ thuật FISH sử dụng để xác định một cách hiệu quả số lượng và vị trí của các đoạn DNA đặc hiệu trên NST ở kỳ giữa hoặc trong nhân tế bào ở gian kỳ.

Việc thực hiện kỹ thuật FISH trên tế bào ở gian kỳ giúp cho thời gian thực hiện xét nghiệm nhanh hơn so với việc lập karyotype [26].

Kỹ thuật định lượng huỳnh quang PCR (Quantitative Fluorescence - Polymerase Chain Reaction)

Từ năm 1993, kỹ thuật QF-PCR có thể chẩn đoán nhanh và chính xác lệch bội NST 21, 18, 13 và NST giới tính. QF-PCR dựa trên cơ sở sử dụng các cặp mồi gắn huỳnh quang để khuếch đại các chuỗi DNA có trình tự lặp lại

ngắn (STR - Short Tandem Repeat) đặc hiệu cho các NST và có tính đa hình rất cao. Sản phẩm sau khi khuếch đại được điện di phân tách đoạn và định lượng bằng máy giải trình tự DNA tự động [27].

Kỹ thuật lai so sánh bộ gen (CGH - Array Comparative Genomic Hybridization)

Kỹ thuật array CGH cho phép khắc phục những nhược điểm của kỹ thuật karyotype và kỹ thuật FISH. Với kỹ thuật array CGH, bất thường NST dạng vi mất đoạn hoặc vi nhân đoạn có thể được phát hiện một cách dễ dàng. Kỹ thuật array CGH thực hiện việc so sánh mẫu DNA cần phân tích với mẫu DNA chứng và thông qua sự khác biệt giữa 2 DNA để phát hiện mất đoạn hoặc nhân đoạn nếu có trên DNA [28].

Kỹ thuật Prenatal BoBs (PN BoBs - Prenatal BACs-on-Beads)

Kỹ thuật PN BoBs là kỹ thuật di truyền phân tử sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán trước sinh. Kỹ thuật dựa trên công nghệ sử dụng mẫu dò là các dòng NST nhân tạo có chứa các đoạn ngắn DNA người có gắn hạt từ, thông qua sự khác biệt giữa DNA mẫu với DNA chứng để phát hiện mất đoạn hoặc nhân đoạn trên DNA dựa trên khả năng bắt cặp giữa các DNA dò với một mạch đơn của DNA mẫu theo nguyên tắc bổ sung giữa các base khi phản ứng lai xảy ra [29].

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

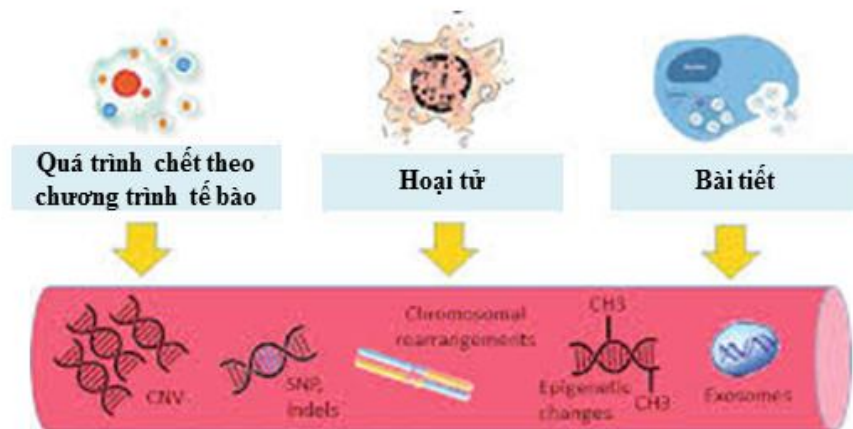
1.3.1. Lịch sử phát hiện DNA tự do trong máu thai phụ

Năm 1948, lần đầu tiên, Mandel và Métais báo cáo phát hiện acid nucleic ngoài tế bào trong huyết tương của người. Một số tác giả khác cũng có những quan sát tương tự như vậy, nhưng phải đến năm 1969, khi Walknowska và cộng sự phát hiện được những tế bào lympho mang NST Y trong máu của thai phụ mang thai nam, người ta mới chắc chắn được rằng tế bào thai thực sự có lưu hành trong máu thai phụ [30]. Năm 1997, Lo và cộng

sự phát hiện có sự lưu hành của DNA thai tự do (cell free fetal DNA - cffDNA) trong huyết tương của thai phụ mang thai nam khi phát hiện ra trình tự của NST Y [31]. cffDNA chiếm 10,0 - 20,0% DNA tự do trong huyết tương [32]. Việc phát hiện cffDNA trong huyết tương thai phụ được coi là bước tiến đột phá, cho thấy cffDNA là nguồn mẫu lý tưởng trong sàng lọc trước sinh lệch bội NST.

1.3.2. Nguồn gốc DNA tự do trong huyết tương

Rất nhiều nghiên cứu đã cố gắng tìm hiểu nguồn gốc của DNA tự do lưu hành trong huyết tương (hình 1.7). Đầu tiên là quá trình chết theo chương trình của tế bào (apoptosis) được coi là đóng vai trò quan trọng trong việc giải phóng DNA tự do vào vòng tuần hoàn [33]. Trong quá trình quá trình này, enzym caspase được kích hoạt, dẫn đến sự phân hủy của chất nhiễm sắc thành oligo và mononucleosome, DNA tự do được giải phóng từ quá trình phân hủy nucleosome. Tiếp theo là một số tế bào có nhân giải phóng DNA tự do vào vòng tuần hoàn. DNA tự do có nguồn gốc từ hệ thống tạo máu ở người khỏe mạnh và từ người hiến trên bệnh nhân được cấy ghép tủy xương. Quá trình hoại tử cũng đóng vai trò trong việc tạo ra DNA tự do trong huyết tương [34].

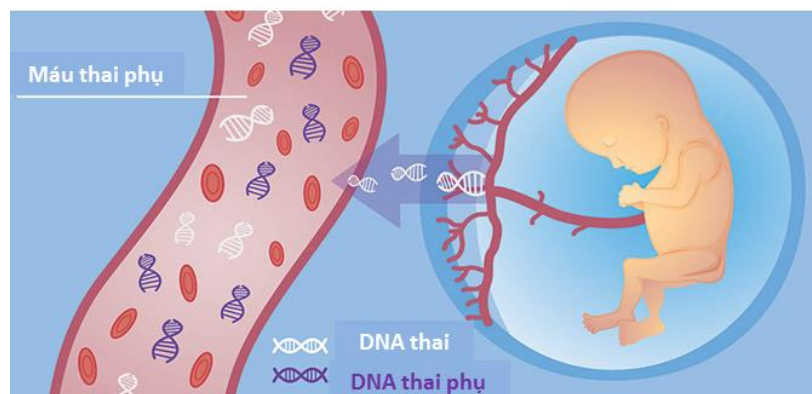


Hình 1.7. Cơ chế giải phóng DNA tự do

(Nguồn: <https://www.researchgate.net/publication/310426921>)

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

Nhiều bằng chứng đã chỉ ra rằng DNA thai tự do (cffDNA) có nguồn gốc từ rau thai (hình 1.8) [35]. cffDNA có thể phát hiện sớm từ 5 - 7 tuần thai [36]. Nồng độ cffDNA tăng theo tuổi thai [37]. Ngoài ra, quá trình chết theo chương trình của tế bào rau thai tăng đáng kể theo tuần thai và trên những thai phụ tiền sản giật [38]. cffDNA là các phân mảnh DNA ngắn, 80,0% có chiều dài < 200 bp, tương đương đoạn DNA ngắn được giải phóng từ quá trình chết theo chương trình của tế bào [39], chiếm 10,0 - 20,0% DNA tự do trong huyết tương [32]. Thời gian bán hủy trung bình của cffDNA là 16,3 phút (4 - 30 phút) [40], cffDNA không thể phát hiện sau sinh 2 giờ [40]. Các nghiên cứu đã chỉ ra cffDNA đào thải qua gan [41]. Ngoài ra, hệ thống miễn dịch của thai phụ như lách và tế bào lympho cũng liên quan đến việc đào thải cffDNA [42].



Hình 1.8. DNA thai tự do trong máu thai phụ

(Nguồn: <http://embryoplus.gr/en/cell-free-dna-nipt>)

1.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến nồng độ cffDNA

Nồng độ cffDNA dao động rất lớn trong quá trình mang thai và bị ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố khác nhau. Lo và cộng sự đã chứng minh rằng nồng độ cffDNA tương quan thuận với tuổi thai, chiều dài đầu mông của thai (CRL), thai phụ có hút thuốc, nồng độ PAPP-A, FBhCG, PIGF trong huyết

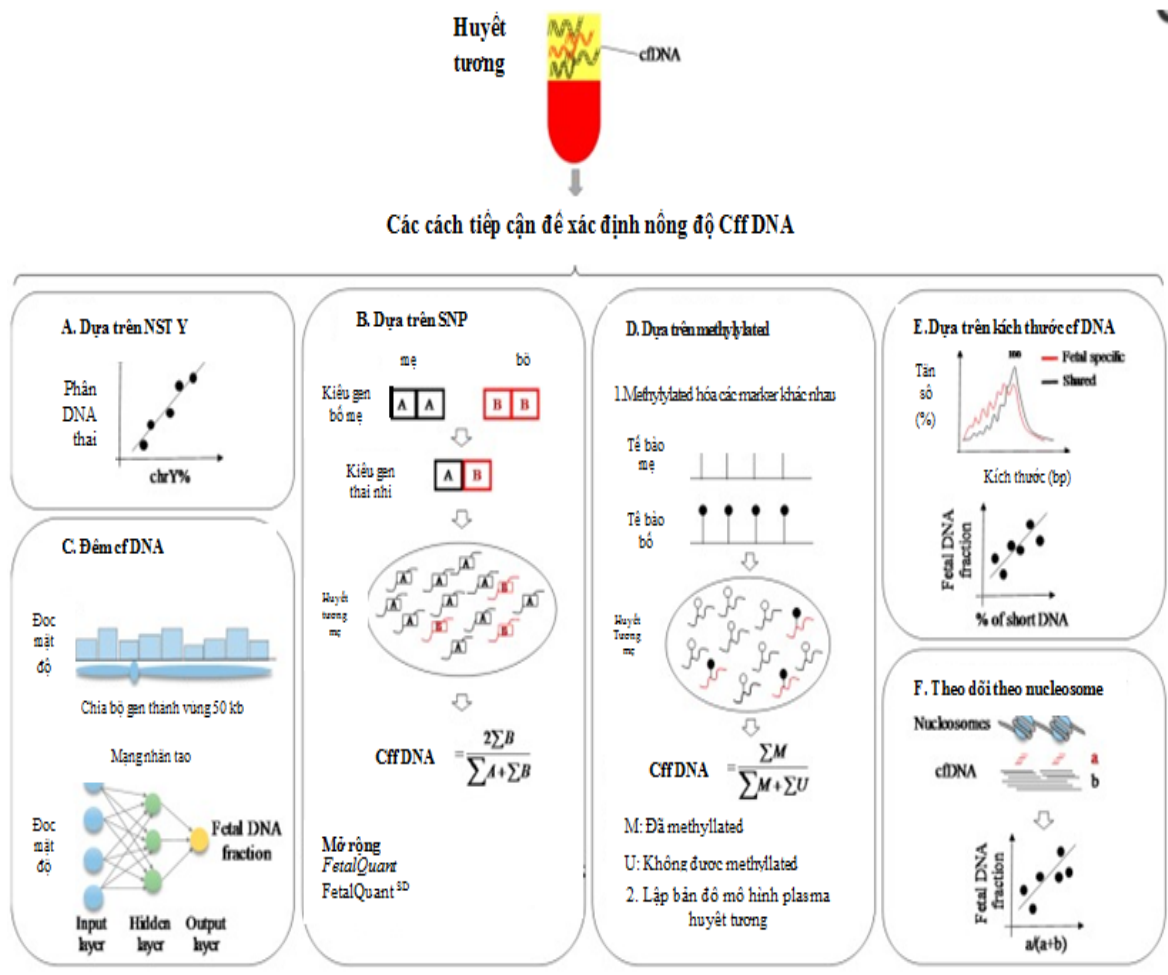
thanh thai phụ [37],[43], thai phụ có bệnh tự miễn (bệnh lupus ban đỏ hệ thống) [44]. Nồng độ cffDNA tương quan nghịch với cân nặng và chỉ số khối cơ thể thai phụ (BMI) [37]. Nồng độ cffDNA cao gấp 1,6 lần ở thai phụ mang thai đôi so với thai đơn, các yếu tố khác như tăng huyết áp cũng có thể làm giảm nồng độ cffDNA, một số yếu tố như thai phụ mắc bệnh tiểu đường, bệnh lý tuyến giáp, nhiễm virus viêm gan B (HBsAg) không ảnh hưởng đến nồng độ cffDNA [45]. Có rất nhiều nghiên cứu chứng minh nồng độ cffDNA có liên quan đến lệch bội NST, nồng độ cffDNA giảm trong trường hợp trisomy 18, 13, monosomy X và thể tam bội, nồng độ cffDNA tăng trong trường hợp trisomy 21 [46]. Không có sự tương quan giữa nồng độ cffDNA và tuổi mẹ, giới tính thai, độ mờ da gáy thai. Tuy nhiên, không phải tất cả các nghiên cứu đều xác nhận điều này [37]. Vì vậy, ACMG (Hiệp hội gen và di truyền y học của Hoa Kỳ) khuyến cáo nên tư vấn thủ thuật xâm lấn cho thai phụ có nồng độ cffDNA thấp [7].

1.3.5. Các phương pháp tiếp cận tin sinh học xác định nồng độ cffDNA

Việc phát hiện cffDNA đã tạo ra một sự thay đổi lớn trong sàng lọc trước sinh không xâm lấn (NIPS). Hiện nay, một loạt các phương pháp tiếp cận xét nghiệm NIPS sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) đã được phát triển nhanh chóng trong y học lâm sàng, trong đó nồng độ cffDNA là một thông số quan trọng để đảm bảo độ chính xác cho kết quả xét nghiệm. Nếu có đủ nồng độ cffDNA trong mẫu và trong các giai đoạn kiểm soát chất lượng xét nghiệm, thì xét nghiệm có thể cung cấp số đếm chính xác của các đoạn đọc DNA. Nồng độ cffDNA càng lớn, càng có khả năng phân biệt thai bình thường với thai lệch bội NST, đặc biệt là trisomy 21 [47]. Ngưỡng nồng độ cffDNA phát hiện trisomy trong một số nghiên cứu là $\geq 4\%$ [48],[49],[50].

Hiện nay, có nhiều thuật toán khác nhau được sử dụng để tính toán nồng độ cffDNA, các mô hình thuật toán tính nồng độ cffDNA phụ thuộc vào phương pháp tiếp cận của từng mô hình (hình 1.9). Trong các nghiên cứu ban đầu, các chỉ thị di truyền nằm trên NST Y được thừa hưởng từ người cha, như gen SRY, DYS14 và ZFY. Các marker này được sử dụng để xác định nồng độ cffDNA dựa trên kỹ thuật PCR [51]. Ví dụ, tỷ lệ của nồng độ các trình tự từ NST Y với nồng độ các trình tự từ một NST mục tiêu được sử dụng để xác định tỷ lệ cffDNA. Xét nghiệm NIPS sử dụng phương pháp giải trình tự song song số lượng lớn các đoạn DNA ngắn (MPS), tỷ lệ các trình tự đọc từ NST Y có thể được coi là tỷ lệ cffDNA. Mặc dù những phương pháp này rất đơn giản và chính xác nhưng chỉ áp dụng cho những thai phụ mang thai nam [51]. Phương pháp dựa vào sự khác biệt đa hình đơn nucleotide (single nucleotide polymorphism - SNP) giữa DNA tự do của mẹ và thai. Hạn chế của phương pháp này là yêu cầu độ bao phủ khoảng 120x bằng giải trình tự đích để xác định alen của thai nhi, vì vậy giá thành của xét nghiệm tăng lên rất cao [52]. Phương pháp dựa trên kích thước DNA tự do, DNA thai ngắn hơn DNA mẹ. Sử dụng giải trình tự hai chiều (paired-end sequencing) để xác định trình tự của đoạn DNA. Phương pháp có độ chính xác không cao và chi phí cao do giải trình tự hai chiều [38]. Phương pháp dựa trên sự khác biệt về đặc điểm methyl hóa giữa DNA thai và DNA mẹ để ước tính nồng độ cffDNA (methyl hóa DNA là quá trình gắn nhóm methyl vào nucleotide cytosine). Phương pháp đòi hỏi xử lý các gốc CpG và giải trình tự toàn bộ bộ gen đã bisulfite gây tốn kém và không thể áp dụng cho xét nghiệm thường quy [53]. Gần đây, phương pháp đếm số lượng đoạn đọc (SeqFF) đã được phát triển, nhằm tính toán trực tiếp nồng độ cffDNA từ dữ liệu thường quy mà không cần thêm thông tin nào. Trong phương pháp này, sử dụng giải trình tự ngẫu nhiên một chiều (single-end random sequencing), Phương pháp SeqFF sử dụng mô hình hồi quy đa biến bao gồm 2 mô hình hồi quy (mạng lưới đàn hồi

(elastic net) và tiêu chuẩn chọn lựa thứ hạng (weighted rank selection criterion, WRSC)) nhằm ước tính nồng độ cfDNA. Đầu tiên, bộ gen được chia thành nhiều vùng (bin), mỗi vùng có kích thước 50kb, sau đó sử dụng mô hình hồi quy tuyến tính (weighted linear regression model) kết hợp đếm các đoạn đọc DNA trên tất cả các vùng của NST thường để dự đoán số lượng đoạn đọc cho NST Y (trong mô hình mạng lưới đàn hồi) hoặc số lượng đoạn đọc DNA cho từng vùng riêng biệt trên NST Y (mô hình WRSC). Nồng độ cfDNA được ước tính là trung bình của hai mô hình. Phương pháp SeqFF có thể áp dụng cho cả thai phụ mang thai nữ [46].



Hình 1.9. Các cách tiếp cận để xác định nồng độ cfDNA

(Nguồn: Xianlu Laura Peng, Peiyong Jiang, 2017)

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

1.3.6.1. Xác định giới tính thai và chẩn đoán bệnh di truyền đơn gen

Việc xác định giới tính thai bằng cffDNA có thể thực hiện từ 6 - 7 tuần thai, nhằm quản lý sớm thai phụ có nguy cơ mang thai mắc các bệnh di truyền liên kết NST giới tính X như bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh, nhược cơ Duchenne, hội chứng di truyền có nhiều bất thường, đặc biệt là sự mơ hồ về bộ phận sinh dục [54].

1.3.6.2. Xác định nhóm máu RhD của thai

cffDNA được ứng dụng để xác định nhóm máu RhD thai ở những thai phụ nhóm máu RhD âm tính. Khi thai phụ nhóm máu RhD âm tính mang thai nhóm máu RhD dương tính có nguy cơ tạo ra kháng thể phá vỡ hồng cầu và gây ra bệnh tan máu trầm trọng. Việc phát hiện nhóm máu RhD bằng cffDNA trên những thai phụ có nhóm máu RhD âm tính giúp cho việc quản lý thai ở giai đoạn sớm [55].

1.3.6.3. Dự đoán nguy cơ tiền sản giật

Papantoniou và cộng sự (2013) đã chứng minh ở những thai phụ tuần thai từ 11 - 13 tuần có nồng độ cffDNA trong huyết tương tăng cao so với thai phụ bình thường và những thai phụ này sau đó tiến triển thành tiền sản giật [38]. Nghiên cứu của Bianchi (2004) đã đưa ra giả thuyết nồng độ cffDNA tăng do 2 nguyên nhân: đầu tiên là do sự hoại tử của rau thai hoặc các tế bào chết theo chương trình, tiếp theo là do các triệu chứng của tiền sản giật làm rối loạn các chức năng của thai phụ kéo theo rối loạn sự bài tiết cffDNA [56]. Như vậy, cơ chế của sự gia tăng nồng độ cffDNA trong tuần hoàn thai phụ là do tăng giải phóng cffDNA vào tuần hoàn thai phụ và/hoặc làm giảm lượng DNA tự do từ máu thai phụ. Chính vì vậy, xác định nồng độ cffDNA trong huyết tương thai phụ có giá trị dự báo sớm những thai phụ có nguy cơ tiến triển tiền sản giật.

1.3.6.4. cffDNA và hội chứng thai chậm phát triển trong buồng tử cung

Hội chứng thai chậm phát triển trong buồng tử cung (intrauterine growth restriction - IUGR) là một rối loạn phức tạp của thai kỳ do nhiều nguyên nhân khác nhau. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra nồng độ cffDNA ở thai phụ mắc hội chứng IUGR thấp hơn ở thai phụ mắc tiền sản giật và cao hơn thai phụ bình thường, có thể liên quan đến sự thiếu dinh dưỡng rau thai [57].

1.3.6.5. cffDNA và sinh non

Sinh non là sinh trước tuần thứ 37 của thai kỳ, là nguyên nhân chính gây tử vong sơ sinh và những biến chứng lâu dài ở trẻ sơ sinh. Nồng độ cffDNA là một chỉ điểm tiên đoán về rối loạn chức năng giảm oxy máu rau thai gây sinh non, nồng độ cffDNA tăng ở những thai phụ có nguy cơ sinh non tự phát cao hơn do sinh non hoặc do vỡ ối sớm [58]. Nhiều nghiên cứu cho rằng giải phóng cffDNA là kết quả của sự khởi đầu việc phá vỡ hàng rào rau thai dự đoán về chuyển dạ [58].

1.3.6.6. cffDNA và các bệnh lý liên quan đến quá trình mang thai

Vora và cộng sự cho thấy có sự tương quan nghịch giữa chỉ số khối cơ thể (BMI) và nồng độ cffDNA, có thể liên quan tới tăng sự hủy hoại mô mỡ và quá trình apoptosis mạch máu [59]. Nồng độ cffDNA tăng ở thai phụ có chứng nghén nặng (HG - hyperemesis gravidarum), do tế bào lá nuôi phôi có thể bị tổn thương nhiều hơn trong suốt quá trình hình thành rau thai.

Nồng độ cffDNA tăng trong các trường hợp tiền sản giật, sinh non, thai chậm phát triển trong buồng tử cung...nguyên nhân do sự phá hủy bởi hệ thống miễn dịch thai phụ của các tế bào thai, dẫn đến phá vỡ hàng rào rau thai, hoặc từ rau thai và các tế bào thai trải qua quá trình chết theo chương trình của tế bào [60].

1.3.6.7. Sàng lọc lệch bội NST thai

Ứng dụng phân tích cffDNA dựa trên phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) bắt đầu từ năm 2011 [61]. Kể từ đó đến nay, xét nghiệm phân tích cffDNA (NIPS) được ứng dụng rộng rãi trong thực hành lâm sàng, mặc dù vẫn chưa được coi là xét nghiệm sàng lọc bước đầu. Nhiều nghiên cứu cho thấy xét nghiệm NIPS có tỷ lệ phát hiện trisomy 21 lên tới trên 99,0% với tỷ lệ dương tính giả thấp 0,1% [7]. Xét nghiệm NIPS có ưu thế hơn hẳn các phương pháp sàng lọc trước sinh truyền thống, giúp làm giảm đáng kể thủ thuật xâm lấn không cần thiết.

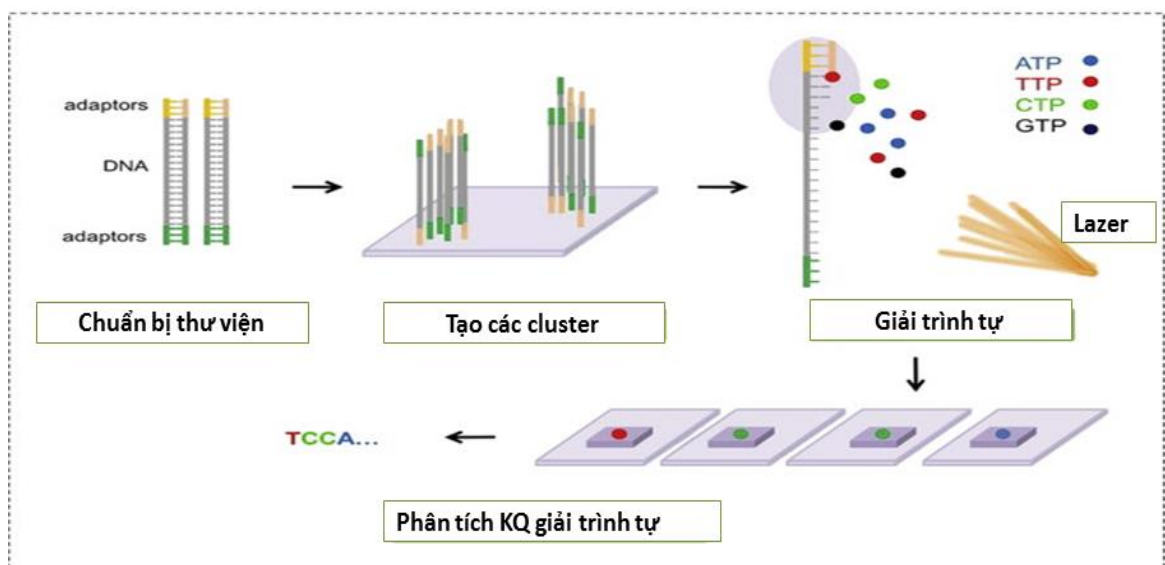
1.4. Giải trình tự gen thế hệ mới ứng dụng trong xét nghiệm NIPS

Giải trình tự gen thế hệ mới (Next-Generation Sequencing - NGS) là công nghệ giải trình tự đồng thời, thông lượng cao được phát triển đã vài thập kỷ sau kỹ thuật giải trình tự của Sanger [62]. NGS được ứng dụng rất rộng rãi trong xét nghiệm NIPS. Tuy nhiên nồng độ cffDNA dao động trong khoảng rất rộng, do đó để đạt được độ nhạy và độ đặc hiệu tối đa, xét nghiệm NIPS dựa trên NGS phải xác định được cả nồng độ cffDNA và khả năng lệch bội NST thai.

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 hình thành 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.

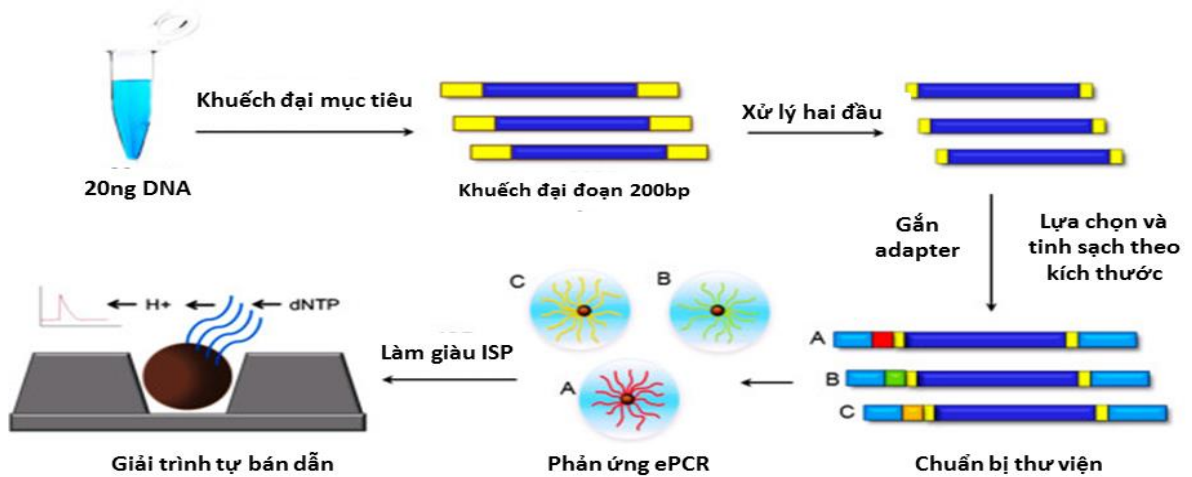
+ Nguyên lý giải trình tự Illumina sử dụng công nghệ đọc trình tự theo nguyên lý tổng hợp (Sequencing By Synthesis - SBS) kết hợp với việc sử dụng các nucleotide có gắn tín hiệu huỳnh quang và khóa dừng thuận nghịch để đọc và nhận biết trình tự một cách trực tiếp (hình 1.10). Chiều dài đoạn đọc DNA khoảng 200 - 250bp và thời gian giải trình tự là 23 giờ. Các hệ thống máy giải trình tự của Illumina: HiSeq, HiSCAnSQ, Genome Analyzer IIX, MiSeq, Next Seq, NOVA Seq.



Hình 1.10. Giải trình tự tổng hợp

(Nguồn: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/illumina-dye-sequencing>)

+ Phương pháp 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 (hình 1.11).



Hình 1.11. Giải trình tự bán dẫn

(Nguồn: <https://www.researchgate.net/figure/Semiconductor-sequencing>)

Đầu tiên một loại dNTP được bơm vào các giếng trên đĩa, DNA polymerase xúc tác cho phản ứng kéo dài chuỗi DNA, tại đó từng dNTP được thêm vào chuỗi DNA sẽ giải phóng ra PPi và H^+ . Số lượng H^+ giải phóng ra sẽ tỷ lệ thuận với số lượng phân tử của một loại dNTP được gắn vào chuỗi. H^+ được giải phóng sẽ làm giảm pH và tăng điện tích ở khay cảm ứng bán dẫn, dẫn tới chênh lệch điện thế bộ phận truyền cảm ứng và xuất hiện dòng điện, tín hiệu điện hóa sẽ được ghi nhận ở phần mềm máy tính. Từng loại dNTP sẽ được bơm vào trong giếng phản ứng luân phiên nối tiếp nhau. Ghép nối các đoạn DNA đã được giải trình tự bằng phần mềm tin sinh để tạo ra một trình tự đầy đủ của bộ gen. Chiều dài đoạn đọc chỉ khoảng 100 - 250bp. Thời gian giải trình tự nhanh chỉ trong 2 - 4 giờ, giá thành rẻ hơn các hệ thống giải trình tự thế hệ mới khác.

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 trong lâm sàng [63]: giải trình tự song song số lượng lớn ngẫu nhiên toàn bộ bộ gen (Whole Genome Sequencing - WGS/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.

1.4.2.1. Giải trình tự song song số lượng lớn ngẫu nhiên toàn bộ bộ gen

Phương pháp giải trình tự song song số lượng lớn ngẫu nhiên toàn bộ bộ gen (MPSS) hay còn gọi là phương pháp đếm được sử dụng trong sàng lọc lệch bội NST dựa vào giải trình tự ngẫu nhiên các đoạn DNA trong huyết tương thai phụ. Cách tiếp cận này cho phép hàng triệu phân mảnh DNA ngắn được giải trình tự nhanh chóng và đồng thời chỉ trong một lần giải trình tự. Dữ liệu sau khi giải trình tự được tổng hợp và lắp ghép thành trình tự bộ gen hoàn chỉnh rồi so sánh với trình tự bộ gen tham chiếu để xác định nguồn gốc của NST. Nếu số lượng trình tự của NST vượt quá ngưỡng đại diện cho NST đó, kết quả dương tính với trisomy NST [8],[9].

1.4.2.2. Giải trình tự mục tiêu các vùng gen quan tâm bằng MPS

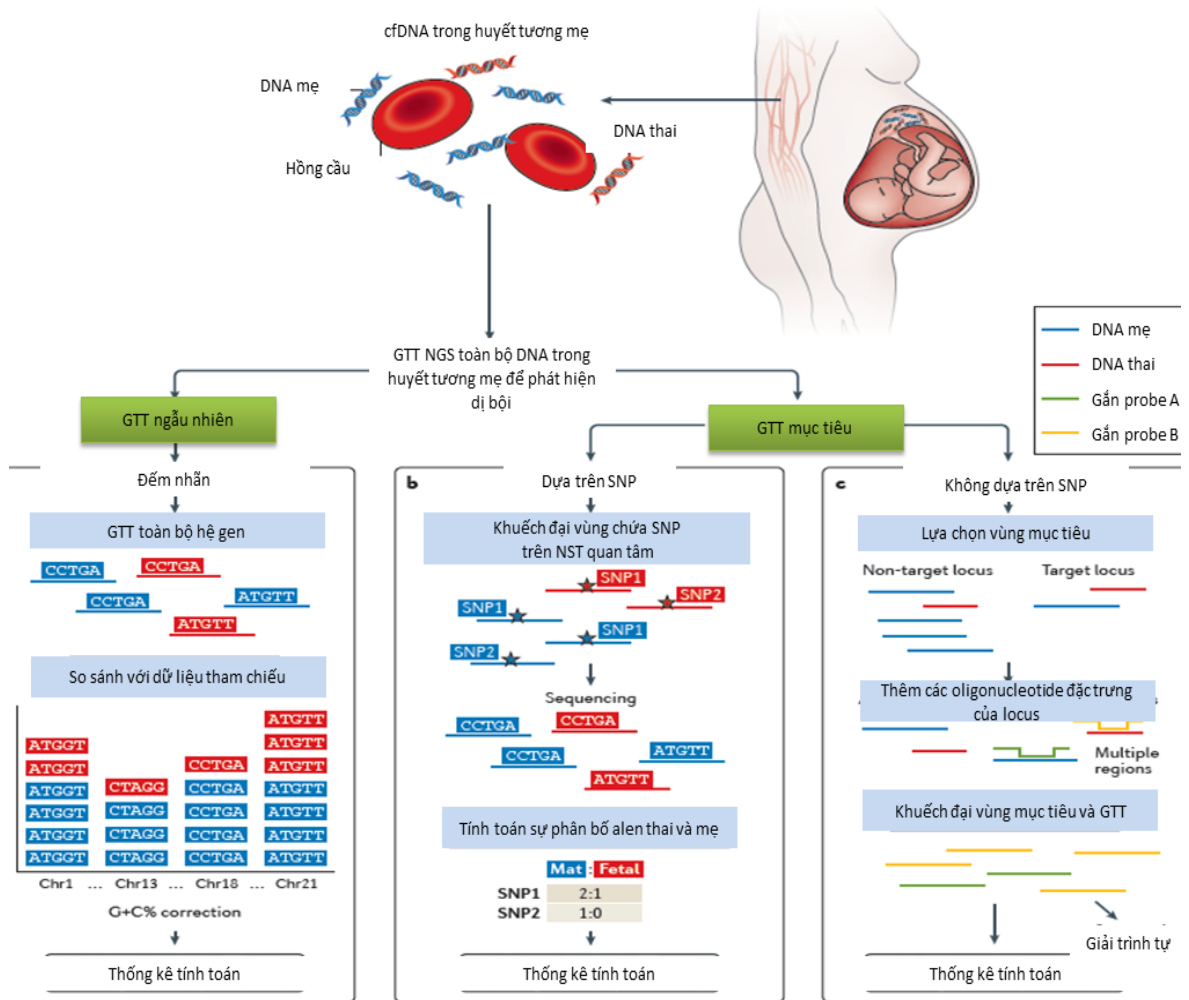
Giải trình tự mục tiêu các vùng gen quan tâm bằng MPS (CSS) là khuếch đại có chọn lọc và giải trình tự các vùng gen quan tâm [38]. Mẫu sẽ được làm giàu những vùng NST mục tiêu như NST 13, 18, 21, X và Y với những đầu dò đặc hiệu của NST trước khi được giải trình tự.

1.4.2.3. Giải trình tự bằng phân tích kiểu gen dựa vào đa hình đơn nucleotide

Giải trình tự bằng phân tích kiểu gen dựa vào đa hình đơn nucleotide (SNP) là khuếch đại sử dụng multiplex PCR và giải trình tự hàng ngàn SNPs của NST mục tiêu. Phương pháp SNP phân tích phân tích lượng alen tương đối tại các locus đa hình để phát hiện lệch bội NST thai [64].

Các phương pháp giải trình tự phát hiện lệch bội NST 21 và 18 với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, trisomy 13 và lệch bội NST giới tính có độ nhạy và độ đặc hiệu thấp hơn. Điều này có thể giải thích một phần là do biến đổi trong quá trình khuếch đại dẫn đến hàm lượng guanosine-cytosine (GC) khác nhau

trong NST 13 và NST X so với NST 21 và 18. Ngoài ra, các phương pháp giải trình tự mục tiêu (CSS hoặc SNP) sẽ không phát hiện ra những bất thường ngoài NST mục tiêu, do vậy hạn chế khả năng phát hiện ngẫu nhiên.



Hình 1.12. Các phương pháp sử dụng trong sàng lọc DNA thai tự do
(Nguồn: <https://www.semanticscholar.org/paper/Prenatal-and-pre-implantation-genetic-diagnosis-Vermeesch-Voet>)

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

Trong những năm gần đây, với sự ra đời của xét nghiệm sàng lọc trước sinh không xâm lấn (NIPS) đã làm thay đổi nhanh chóng mô hình xét nghiệm

trước sinh. Xét nghiệm NIPS cung cấp một bước trung gian giữa xét nghiệm sàng lọc huyết thanh và xét nghiệm chẩn đoán xâm lấn.

Từ năm 2011, nhiều tổ chức lớn về sản phụ khoa và di truyền trên thế giới đã công bố khuyến cáo sử dụng xét nghiệm NIPS trong thai kỳ, bao gồm ACOG (Hội Thai phụ khoa Hoa Kỳ), SMFM (Hội Y học thai phụ và thai), ISPD (Hiệp hội Chẩn đoán trước sinh quốc tế), ISUOG (Hội Siêu âm thai phụ khoa Thế giới), Hội quốc gia về tư vấn di truyền (NSGC) và ACMG (Hiệp hội về gen và di truyền y học của Hoa Kỳ). Các khuyến cáo đều thống nhất nên lựa chọn xét nghiệm NIPS trên đối tượng thai phụ có nguy cơ cao lệch bội NST thai. Nguy cơ cao thường được xác định theo tiêu chuẩn như tuổi thai phụ ≥ 35 tuổi tại thời điểm sinh, kết quả siêu âm hình thái thai nghi ngờ có nguy cơ lệch bội NST, xét nghiệm sàng lọc hóa sinh nguy cơ cao, tiền sử mang thai mắc trisomy hoặc cha mẹ có chuyển đoạn cân bằng Robertsonia làm tăng nguy cơ trisomy 21 hoặc trisomy 13 [65].

Năm 2015, liên hiệp ACOG/SMFM đưa ra khuyến cáo về việc thực hiện các phương pháp sàng lọc trước sinh truyền thống và đưa ra một số giới hạn của xét nghiệm NIPS, các phương pháp sàng lọc trước sinh truyền thống vẫn là lựa chọn phù hợp nhất để sàng lọc trước sinh cho hầu hết thai phụ trong phần lớn dân số sản khoa nói chung, không khuyến cáo xét nghiệm NIPS trên thai phụ mang thai đôi và đa thai. Tuy nhiên, ACOG và SMFM đều thống nhất thai phụ mang thai đôi vẫn có thể lựa chọn xét nghiệm NIPS và trong những trường hợp đó, nên tư vấn cho thai phụ những ưu điểm và hạn chế của xét nghiệm NIPS. Xét nghiệm NIPS dương tính hay nguy cơ cao nên tư vấn thủ thuật xâm lấn trước khi đưa ra quyết định đình chỉ thai nghén [66]. ISPD đã đưa ra nhiều phương thức sàng lọc trước sinh khác nhau như sàng lọc sơ cấp bằng xét nghiệm NIPS hoặc kết hợp với các phương pháp sàng lọc trước sinh truyền thống khác [67].

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh xét nghiệm NIPS có độ nhạy và độ đặc hiệu cao trên những thai phụ có nguy cơ cao với bất kỳ phương pháp hay

hệ thống giải trình tự nào, điều này đặc biệt đúng trong sàng lọc trước sinh với trisomy 21 và 18 [64],[48],[68]. Trong 1 phân tích tổng hợp của Gil và cộng sự trên 35 nghiên cứu về xét nghiệm NIPS, trong đó 29 nghiên cứu trên thai phụ mang thai đơn và 6 nghiên cứu trên thai phụ mang thai đôi, bao gồm cả nhóm sàng lọc có nguy cơ cao, nhóm sàng lọc sơ cấp và nhóm sàng lọc hỗn hợp [68]. Đối với các nghiên cứu trên thai đơn, tỷ lệ phát hiện gộp của trisomy 21, 18, 13, monosomy X và lệch bội NST giới tính khác lần lượt là 99,7%; 97,9%; 99,0%; 95,8% và 100,0%. Tỷ lệ dương tính giả gộp của trisomy 21, 18 và 13 đều là 0,04%; Với monosomy X và lệch bội NST giới tính khác là 0,14% và 0,004%. Với nghiên cứu trên thai đôi, tỷ lệ phát hiện là 100,0% và tỷ lệ dương tính giả là 0,0% [68]. Nồng độ cffDNA thấp là lý do chính không có kết quả NIPS, chiếm tỷ lệ từ 0,1 - 6,1%, một phần liên quan đến cân nặng thai phụ và thể tích rau thai nhỏ. Trên 60,0% thai phụ sẽ có kết quả NIPS sau xét nghiệm lần 2. Thai phụ mang thai mắc trisomy 18, 13 và monosomy X hay gặp nồng độ cffDNA thấp hơn so với thai phụ có kết quả bộ NST bình thường [66]. Do vậy, nên chỉ định thủ thuật xâm lấn với kết quả xét nghiệm NIPS dương tính hay nguy cơ cao. Trường hợp kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với trisomy 21 thai kỳ 1, nên chỉ định lấy mẫu gai rau. Trong trường hợp kết quả xét nghiệm NIPS dương tính trisomy 18 và 13, theo dõi tiếp bằng siêu âm, nếu phát hiện dị tật hình thái trên siêu âm liên quan đến trisomy 18 và 13, nên thực hiện lấy mẫu gai rau. Nếu không phát hiện dị tật hình thái trên siêu âm, nên chỉ định hút dịch ối để loại trừ kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả do khảm giới hạn rau thai. Kết quả xét nghiệm NIPS nguy cơ thấp hoặc âm tính, nên tiếp tục theo dõi thai bằng siêu âm hình thái thai nhi.

Nguy cơ sau xét nghiệm được sử dụng để thể hiện chính xác hơn khả năng thai mắc trisomy. Khả năng thai mắc trisomy thực sự không chỉ phụ thuộc vào kết quả xét nghiệm NIPS mà còn phụ thuộc vào tỷ lệ mắc trisomy đó trong dân số, được gọi là nguy cơ trước xét nghiệm. Nguy cơ cho trisomy

21, 18, 13 được giảm lần lượt là 333, 47 và 100 lần. Nếu kết quả xét nghiệm CFTS nguy cơ trisomy 21 là 1/100 và kết quả xét nghiệm NIPS nguy cơ thấp, cơ hội thai nhi mắc trisomy 21 là 1/33.300 [68].

Trong một nghiên cứu so sánh hiệu quả của xét nghiệm NIPS và CFTS trong dân số sản khoa chung. Xét nghiệm NIPS trong nhóm dân số sản khoa chung và nhóm nguy cơ thấp đều có tỷ lệ phát hiện cao, tỷ lệ dương tính giả thấp và giá trị tiên đoán dương cao hơn hẳn xét nghiệm CFTS khi phát hiện trisomy 21. Liên quan đến tuổi thai phụ, xét nghiệm NIPS có độ nhạy cao hơn và tỷ lệ dương tính giả thấp hơn so với xét nghiệm CFTS (bảng 1.2) [69].

Điều đáng chú ý là phần lớn các nghiên cứu lâm sàng đã xác nhận các trường hợp khảm, trường hợp karyotype phức tạp và trường hợp nồng độ cfDNA thấp đều bị loại trừ. Điều này có khả năng làm tăng tỷ lệ phát hiện và giảm tỷ lệ dương tính giả của xét nghiệm NIPS [7].

Bảng 1.2. Kết quả phát hiện trisomy 21 theo tuổi thai phụ và nguy cơ*

Kết quả	CFTS	NIPS		
	n=15.841 (DSSK chung)	n=15.841 (DSSK chung)	n=11.994 (< 35 tuổi)	n=14.957 † (Nguy cơ thấp)
TP	30	38	19	8
TN	14.949	15.794	11.969	14.941
FP	854	9	6	8
FN	8	0	0	0
%, 95% CI				
Se	78,9 (62,7-90,4)	100,0 (90,7-100,0)‡	100,0 (82,4-100,0)	100,0 (63,1-100,0)
Sp	94,6 (94,2-94,9)	99,9 (99,9-100,0)§	99,9 (99,9-100,0)	100,0 (99,9-100,0)
PPV	3,4 (2,3-4,8)	80,9 (66,7-90,9)§	76,0 (54,9-90,6)	50,0 (24,7-75,3)
NPV	99,9 (99,9-100,0)	100,0 (99,9-100,0)¶	100,0 (99,9-100,0)	100,0 (99,9-100,0)

Ghi chú: DSSK: dân số sản khoa; TP: dương tính thật; FP: dương tính giả; TN: âm tính thật; FN: Âm tính giả; Se: độ nhạy; Sp: độ đặc hiệu; *P là giá trị so sánh giữa sàng lọc CFTS và NIPS; † Nguy cơ thấp được xác định <1/270 trong sàng lọc CFTS; ‡ P=0,008; § p<0,001; ¶ p=0,005.

Xét nghiệm NIPS có giá trị tiên đoán dương phát hiện trisomy 18 cao hơn hẳn xét nghiệm CFTS (90,0% và 14,0%). Tỷ lệ dương tính giả phát hiện trisomy 13 cao hơn trong xét nghiệm NIPS so với xét nghiệm CFTS (0,02% và 0,25%) (bảng 1.3) [69].

Bảng 1.3. Kết quả phát hiện trisomy 18, 13*

Kết quả	Trisomy 18		Trisomy 13	
	CFTS (n=15.841)	NIPS (n=15.841)	CFTS (n=11.185)	NIPS (n=11.185)
TP (n)	8	9	1	2
TN (n)	15.782	15.830	11.155	11.181
FP (n)	49	1	28	2
FN (n)	2	1	1	0
%, 95% CI				
Se	80,0 (44,4-97,5)	90,0 (55,5-99,7)	50,0 (1,2-98,7)	100,0 (15,8-100,0)
Sp	99,7 (99,6-99,8)	100,0 (99,9-100,0)†	99,7 (99,6-99,8)	100,0 (99,9-100,0)†
PPV	14,0 (6,2-25,8)	90,0 (55,5-99,7)†	3,4 (0,1-17,8)	50,0 (6,8-93,2)
NPV	100,0 (99,9-100,0)	100,0 (99,9-100,0)	100,0 (99,9-100,0)	100,0 (99,9-100,0)

Ghi chú: TP: dương tính thật; FP: dương tính giả; TN: âm tính thật; FN: Âm tính giả; Se: độ nhạy (Sensitivity); Sp: độ đặc hiệu (Specificity); * bao gồm thai phụ mang thai trisomy 13 được chọn vào nghiên cứu sau tháng 9/2012; † P so sánh với CFTS.

Khi so sánh hiệu quả xét nghiệm NIPS trên những thai phụ có nguy cơ cao với các phương pháp sàng lọc trước sinh khác, xét nghiệm NIPS đã được chứng minh là có tỷ lệ phát hiện cao, tỷ lệ dương tính giả thấp hơn và có thể được thực hiện ở tuổi thai sớm hơn. Trong các nghiên cứu tiếp theo, điều tra hiệu quả lâm sàng ở nhóm thai phụ có nguy cơ thấp hoặc nói nhóm dân số sản khoa

chung, xét nghiệm NIPS tiếp tục cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn khi so sánh với các phương pháp sàng lọc trước sinh khác, (bảng 1.4) [70],[71].

Bảng 1.4. So sánh các phương pháp sàng lọc

Phương pháp	cffDNA	CFTS	STS	Sàng lọc tích hợp
Tuổi thai (tuần)	> 10	11-14	15-24	PAPP-A: 9-13; NT: 10-13 QS: 15-24
Tỷ lệ phát hiện (%)				
Trisomy 21	99,2	82,0-87,0	81,0	94,0-96,0
Trisomy 18	96,3	81,0	60,0	90,0
Trisomy 13	91,0	Giới hạn	N/A	Giới hạn

Ghi chú: sàng lọc tích hợp: NT, PAPP, FBhCG, sàng lọc Quad; NT: độ mờ da gáy; STS/QS: sàng lọc thai kỳ 2 (Second Trimester Screening/Quad Screening); w: tuần thai (week); T: trisomy; N/A: không cung cấp (not applicable).

Trong một phân tích tổng hợp của Sian và cộng sự đánh giá tính chính xác của xét nghiệm NIPS phát hiện trisomy 21, 18 và 13 sử dụng phương pháp giải trình tự MPSS, DANSR (*Digital ANalysis of Selected Regions - Phân tích kỹ thuật số của các vùng chọn lọc*) và SNPs. Tổng số 41, 37 và 30 nghiên cứu trên 2012 bài báo cho thấy xét nghiệm NIPS có độ nhạy, độ đặc hiệu cao trên cả đối tượng nguy cơ cao và đối tượng dân số sản khoa chung, do vậy xét nghiệm NIPS có thể được coi là một xét nghiệm sàng lọc trước sinh hiệu quả nhất sàng lọc trisomy 21, 18 và 13 [72]. Sự chính xác của xét nghiệm không có sự khác biệt giữa 3 phương pháp MPSS, DANSR và SNPs. Mặc dù xét nghiệm NIPS có giá trị nhưng không thực sự hoàn hảo, khi so sánh độ nhạy dựa vào nhóm nguy cơ và tuổi thai. Nghiên cứu cho thấy độ nhạy của xét nghiệm NIPS cao hơn trên nhóm nguy cơ cao cũng như nhóm thai phụ thai kỳ 2 và 3. Trong nhóm quần thể dân số sản khoa chung cũng như nhóm thai phụ thai kỳ 1, xét nghiệm NIPS có độ nhạy thấp hơn. Xét nghiệm NIPS có độ nhạy trên nhóm thai phụ mang thai đơn cao hơn trên nhóm thai

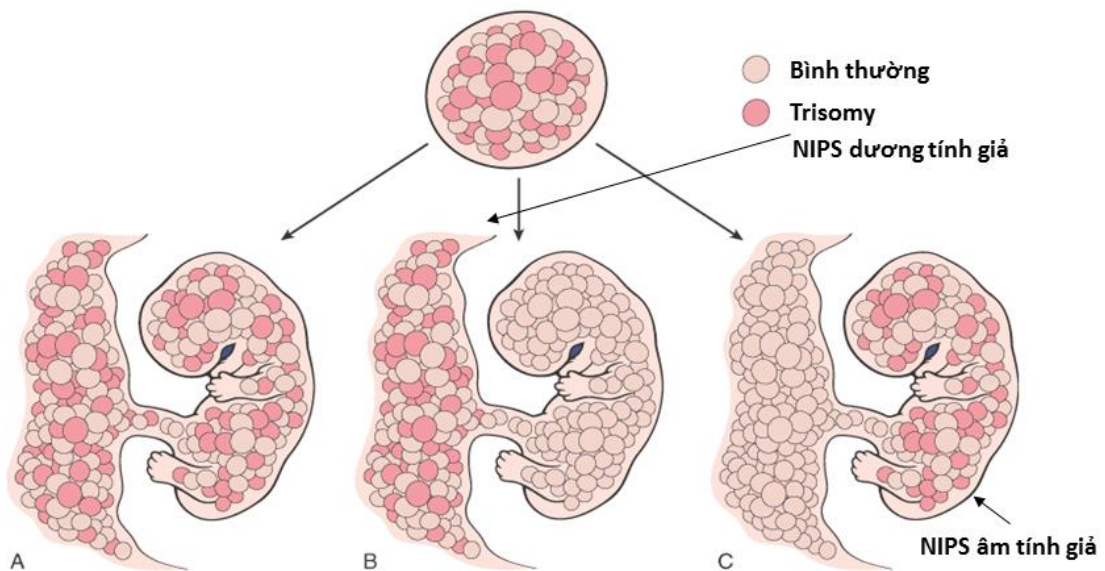
phụ mang thai đôi trong sàng lọc trisomy 21. Ngoài ra, xét nghiệm NIPS có khả năng thất bại cao trên nhóm thai phụ có cân nặng cao (béo phì) và thụ tinh ống nghiệm. Do vậy, không nên sử dụng kết quả xét nghiệm NIPS dương tính để tư vấn thai phụ đình chỉ thai nghén, vì trong nhóm dân số sản khoa chung có đến 20,0% kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả với trisomy 21. Tỷ lệ kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả cao hơn với trisomy 18 và 13, tuy nhiên tỷ lệ kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả rất khác nhau giữa các nghiên cứu (bảng 1.5) [72].

Bảng 1.5. Kết quả sàng lọc trisomy 21, 18, 13

Trisomy	Độ chính xác (%)	Tỷ lệ mắc bệnh (%)	Kết quả	PPV (%)	Khả năng âm tính giả
Sàng lọc trên nhóm dân số sản khoa chung (n = 100.000)					
Trisomy 21	Se=95,9; Sp=99,9 (6 NC)	0,43	TP=417; FP=94 TN=99.471; FN=18	82,0	1/557
Trisomy 18	Se=86,5 Sp=99,8 (5 NC)	0,10	TP=89; FP=154 TN=99.744; FN=14	37,0	1/7194
Trisomy 13	Se=77,5; Sp=99,9 (5 NC)	0,05	TP=40; FP=42 TN=99.906; FN=12	49,0	1/8.506
Sàng lọc trên nhóm thai phụ nguy cơ cao (n = 10.000)					
Trisomy 21	Se=97,0; Sp=99,7 (22 NC)	3,33	TP=324; FP=31 TN=9.636 ; FN=9	91,0	1/1.054
Trisomy 18	Se=93,0; Sp=99,7 (19 NC)	1,5	TP=140; FP=26 TN=9.824; FN=11	84,0	1/930
Trisomy 13	Se=95,0; Sp=99,9 (11 NC)	0,5	TP=47; FP=7 TN=9.943; FN=3	87,0	1/4.265

Ghi chú: TP: dương tính thật; FP: dương tính giả; TN: âm tính thật; FN: Âm tính giả; PPV: Giá trị tiên đoán dương; NPV: giá trị tiên đoán âm; Se: độ nhạy; Sp: độ đặc hiệu; NC: nghiên cứu.

Nhiều nguyên nhân dẫn đến kết quả kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả đã được báo cáo như khám khu trú ở rau thai (*Confined Placental Mosaicism - CPM*) đặc trưng bởi sự khác biệt về bộ NST giữa thai và rau thai, CPM là yếu tố chính gây ra kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh CPM là một hiện tượng sinh học tương đối phổ biến (1,0 - 2,0% thai phụ) [73] do lỗi phân chia NST trong quá trình phân bào phân bào tạo hợp tử. Tế bào lá nuôi phôi có nguồn gốc từ tế bào sinh chất của phôi nang không phải lúc nào cũng đại diện cho thai, trong khi tế bào thai có nguồn gốc từ khối tế bào bên trong (hình 1.13).



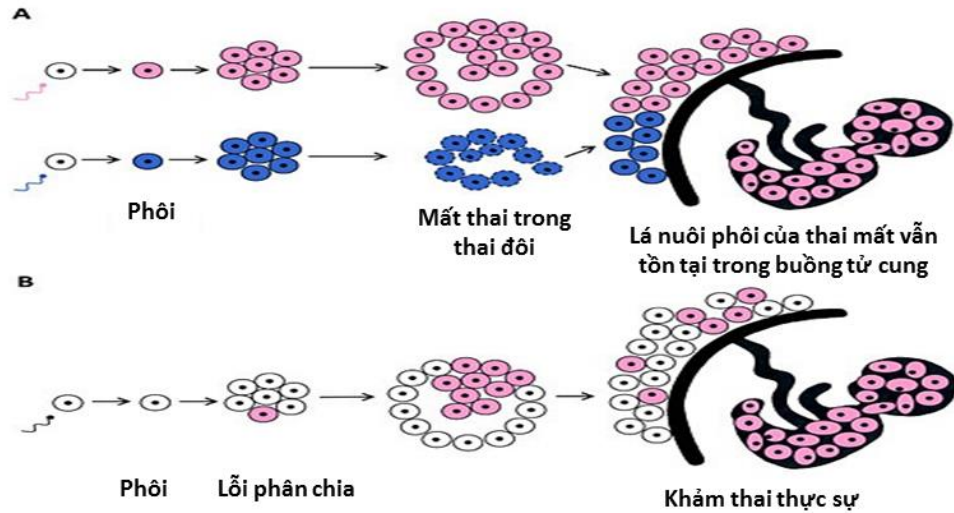
Hình 1.13. Biểu đồ khám NST

A: Khám thai và rau thai; B: Khám giới hạn rau thai (CPM); C: Khám thai

(Nguồn: Kalousek DK (1990). *Confined placental mosaicism and intrauterine development. Pediatr Pathol 10(69)*)

Tiếp theo là hiện tượng mất 1 thai trong thai đôi (Demise of Co-Twin/vanishing twin) [74], người ta ước tính có đến 15,0% xét nghiệm NIPS dương tính giả là kết quả của thai bị mất [75]. Không có hướng dẫn chính thức nào cho biết DNA tự do của thai mất sẽ tồn tại trong thời gian bao lâu.

Do đó, không nên chỉ định xét nghiệm NIPS trong trường hợp mất một thai trong thai đôi. Nên yêu cầu thai phụ siêu âm tại thời điểm làm xét nghiệm NIPS để loại trừ trường hợp mất một thai trong thai đôi.



Hình 1.14. Các trường hợp dương tính giả của xét nghiệm NIPS

A: Mất thai trong thai đôi; B: Khảm khu trú ở rau thai

(Nguồn: [https://nextbio.co.za/category/medical_articles/medical-embryodx/Confined placental mosaicism and its impact on confirmation of NIPT result](https://nextbio.co.za/category/medical_articles/medical-embryodx/Confined_placental_mosaicism_and_its_impact_on_confirmation_of_NIPT_result))

Một nguyên nhân quan trọng nữa dẫn đến kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả là do thai phụ có bất thường NST. Thai phụ chưa được phát hiện khảm trước đây (ví dụ: khảm hội chứng Turner mức độ thấp) có thể dẫn đến kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả với lệch bội NST giới tính thai [76],[77]. Biến thể số lượng bản sao của mẹ (CNV) là thay đổi về cấu trúc NST do nhân đoạn hoặc mất đoạn một vùng gen. Khi vùng gen của thai phụ được nhân lên sẽ làm tăng hoặc giảm chiều dài của NST đó. Kết quả giải trình tự, có sự biểu hiện quá mức hoặc không đúng mức số lượng đoạn đọc DNA từ NST có chứa CNV so với NST tham chiếu, sẽ dẫn đến tăng hoặc giảm nồng độ cfDNA, dẫn đến kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả với trisomy, vi mất đoạn hoặc vi lặp đoạn NST [78].

Thai phụ có khối u hoặc ung thư ác tính cũng là nguyên nhân dẫn đến kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả. Báo cáo đầu tiên vào năm 2013, thai phụ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với trisomy 13 và monosomy 18, xét nghiệm chẩn đoán từ dịch ối có kết quả xét nghiệm karyotype và microarray bình thường. Thai phụ sau đó được chẩn đoán mắc ung thư biểu mô thần kinh di căn giai đoạn sau sinh [79]. Sau đó, bệnh lý ung thư ác tính ở thai phụ đã trở thành một phần của chẩn đoán phân biệt cho kết quả xét nghiệm NIPS bất thường. Người ta cho rằng DNA tự do có xuất phát từ các tế bào ác tính được giải phóng vào vòng tuần hoàn của thai phụ từ quá trình chết theo chương trình của tế bào. Ung thư ác tính đã báo cáo bao gồm ung thư biểu mô tế bào thần kinh, ung thư hạch không Hodgkin, bệnh bạch cầu cấp tính, ung thư hậu môn và ung thư đại trực tràng. Bettgowda và cộng sự đã chỉ ra rằng DNA tự do được tìm thấy ở 80,0% bệnh nhân có ung thư di căn và ở 50,0% bệnh nhân có ung thư tại chỗ [80]. Ước tính 20,0 - 44,0% thai phụ có nguy cơ mắc bệnh ung thư nếu kết quả xét nghiệm NIPS dương tính cùng lúc với nhiều loại lệch bội NST. Những dữ liệu này cần được xác nhận thêm từ nhiều nghiên cứu bổ sung tiếp theo trước khi có thể đưa ra khuyến nghị về cách đánh giá xét nghiệm NIPS [81].

Kết quả xét nghiệm NIPS âm tính giả gặp trong khảm thai (*True Fetal Mosaicism - TFM*), thai nhi có dòng tế bào bất thường, trong khi rau thai lại là dòng tế bào bình thường, mặc dù khả năng này hiếm xảy ra [82].

Tỷ lệ thất bại trong xét nghiệm NIPS dao động từ 0,0 - 12,7%. Trong số thai phụ lấy lại mẫu lần 2, tỷ lệ thất bại khi lặp lại xét nghiệm là 13,9%. Một số bằng chứng chỉ ra tỷ lệ thất bại của xét nghiệm NIPS trên thai phụ mang thai từ 10 tuần là 5,9%. Nghiên cứu tương tự cho thấy tỷ lệ lệch bội NST thai tăng 23,3% trong các mẫu xét nghiệm NIPS thất bại khi so sánh với tỷ lệ lệch bội NST phát hiện ngẫu nhiên là 10,9%. Norton và cộng sự tìm thấy

sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ trisomy ở nhóm xét nghiệm NIPS thất bại là 2,7% cao hơn ở nhóm dân số sản khoa chung là 0,4% [69]. Ngoài ra, sự không phù hợp giữa kết quả xét nghiệm karyotype và kết quả xét nghiệm NIPS có thể do sai sót trong quá trình giải trình tự. Nồng độ cffDNA thấp có thể dẫn đến kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả hoặc âm tính giả. Vì vậy, đảm bảo chất lượng giải trình tự giúp giảm thiểu thất bại trong xét nghiệm NIPS, sẽ làm cải thiện thời gian trả kết quả do xét nghiệm lặp lại là ưu tiên hàng đầu của xét nghiệm NIPS [69].

Xét nghiệm NIPS được sử dụng rộng rãi trong thực hành lâm sàng giúp làm giảm tỷ lệ thủ thuật xâm lấn. Song và cộng sự báo cáo xét nghiệm NIPS giúp làm giảm trên 95,0% các thủ thuật xâm lấn trên thai phụ nguy cơ cao và giảm trên 99,0% tỷ lệ mất thai liên quan đến thủ thuật xâm lấn [83]. Nghiên cứu hồi cứu lớn, trên 15.000 mẫu được thực hiện trong 9 năm tại 1 Bệnh viện ở Hoa Kỳ cho thấy xét nghiệm NIPS giúp làm giảm 76,0% tỷ lệ hút dịch ối và 54,0% tỷ lệ lấy mẫu gai rau [84]. Nghiên cứu so sánh hiệu quả xét nghiệm NIPS với xét nghiệm 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 [85]. Nhiều nghiên cứu khác đã xác nhận hiệu quả giảm tỷ lệ thủ thuật xâm lấn tại các trung tâm chẩn đoán trước sinh [86].

1.4.3. Nghiên cứu về DNA thai tự do tại Việt Nam

Tại Việt Nam, các nghiên cứu phân tích DNA thai tự do (cffDNA) trong sàng lọc và chẩn đoán trước sinh vẫn còn hạn chế. Năm 2010, Nguyễn Thanh Thúy và cộng sự dùng PCR lồng phát hiện cffDNA từ huyết thanh mẹ và ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh [87]. Năm 2014, Triệu Tiến Sang và

cộng sự đã bước đầu xây dựng được quy trình chiết tách DNA tự do, phát hiện cffDNA trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật PCR cho thấy nồng độ cffDNA ở các trường hợp thai lệch bội NST cao gấp 4,5 lần so với trường hợp không lệch bội NST, cffDNA chỉ tồn tại sau sinh khoảng 2 giờ [88]. Năm 2019, Nguyễn Thị Phương Lan và cộng sự sử dụng kỹ thuật Realtime PCR phát hiện cffDNA trong huyết tương thai phụ dự báo sớm tiền sản giật, kết quả cho thấy nồng độ cffDNA trong huyết tương thai phụ có xu hướng tăng dần theo tuổi thai tương ứng [89]. Xét nghiệm NIPS sàng lọc lệch bội NST thai bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới đã được giới thiệu vào Việt Nam trong những năm gần đây bởi một số công ty tư nhân. Hầu hết các trường hợp muốn thực hiện xét nghiệm NIPS thường phải lấy mẫu và gửi sang nước ngoài giải trình tự và phân tích kết quả. Cho đến tháng 5/2016, xét nghiệm NIPS được chính thức triển khai đầu tiên tại Trung tâm Sàng lọc, Chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội trên hệ thống máy giải trình tự gen thế hệ mới Ion Torrent. Sau đó, Bệnh viện Từ Dũ và một số công ty tư nhân cũng bắt đầu triển khai xét nghiệm NIPS trên các hệ thống và các kit hóa chất khác nhau. Tuy nhiên, chưa có một nghiên cứu nào ở miền Bắc Việt Nam công bố về giá trị của xét nghiệm NIPS trong phát hiện lệch bội NST thai. Vì vậy, rất cần nghiên cứu đánh giá về hiệu quả của xét nghiệm NIPS trên hệ thống giải trình tự gen thế hệ mới, giúp các thầy thuốc lâm sàng có thêm một phương pháp sàng lọc lệch bội NST thai từ giai đoạn sớm, giúp giảm thiểu nguy cơ cũng như các biến chứng trên thai phụ và thai nhi.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Sàng lọc trước sinh không xâm lấn phân tích cffDNA được tiến hành với đối tượng thai phụ có nguy cơ cao mang thai lệch bội NST do sàng lọc bằng các xét nghiệm trước sinh truyền thống (CFTS và triple test) tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội từ năm 2016 đến năm 2019.

- Chất liệu nghiên cứu: 10mL máu tĩnh mạch được lấy vào ống chuyên dụng Cell-Free DNA BCT (Streck BCTs).

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 ($NT \geq 2\text{mm}$).
- 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 thai kỳ 1 (CFTS) hoặc 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 có tiền sử truyền máu, phẫu thuật ghép tạng, điều trị tế bào gốc, liệu pháp miễn dịch, xạ trị trong vòng 3 tháng.
- Thai phụ được cho trứng, thai phụ mang thai hộ.
- Thai phụ có lịch 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, ...) 1 tháng sau sinh.

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Được tính theo công thức tính cỡ mẫu dành cho các nghiên cứu chẩn đoán [70].

Cỡ mẫu xác định độ nhạy:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{Sen(1-Sen)}{W^2 p_{dis}}$$

Trong đó:

$Z_{1-\alpha/2}^2$: là giá trị tới hạn của phân phối chuẩn, với độ tin cậy 95% thì

$$Z_{1-\alpha/2}^2 = 1,96^2$$

Sen : độ nhạy, xác định từ nghiên cứu trước $Sen = 0,99$.

W : sai số của nghiên cứu, chọn $W=0,018$.

p_{dis} : tỷ lệ lưu hành bệnh trong quần thể, theo nghiên cứu của Trần Danh Cường, $p_{dis} = 0,11$ [15].

Với các giá trị trên, cỡ mẫu để xác định độ nhạy là 1068. Dự phòng tỷ lệ thất bại và bỏ cuộc (10%) và làm tròn, nghiên cứu với cỡ mẫu cần thiết là 1200.

Cỡ mẫu xác định độ đặc hiệu:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{Sp(1-Sp)}{W^2(1-p_{dis})}$$

Trong đó:

$Z_{1-\alpha/2}^2$: là giá trị tới hạn của phân phối chuẩn, với độ tin cậy 95% thì

$$Z_{1-\alpha/2}^2 = 1,96^2$$

Sp : độ đặc hiệu, xác định từ nghiên cứu trước $Sen = 0,98$

W : sai số của nghiên cứu, chọn $W=0,018$

p_{dis} : tỷ lệ lưu hành bệnh trong quần thể, theo nghiên cứu của Trần Danh Cường, $p_{dis} = 0,11$ [15].

Với các giá trị trên, cỡ mẫu để xác định độ đặc hiệu là 212. Dự phòng tỷ lệ thất bại và bỏ cuộc (10%) và làm tròn, ta nghiên cứu với cỡ mẫu cần thiết là 300.

Như vậy cỡ mẫu của nghiên cứu là 1200.

Thực tế, nghiên cứu đã chọn được 1231 thai phụ đủ tiêu chuẩn và đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2.3. Phương tiện nghiên cứu

Các phương tiện phục vụ cho nghiên cứu được sử dụng tại Trung tâm Sàng lọc, Chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội có tiêu chuẩn chính xác cao.

2.2.3.1. Trang thiết bị và máy móc phục vụ nghiên cứu

- Máy ly tâm lạnh sử dụng cho ống máu 10mL; 1,5/2 mL.
- Máy tách chiết DNA tự động: PerkinElmer Prepito-D.
- Máy quang phổ phân tích chuỗi DNA kép: Life Technologies.
- Máy phân tích DNA tự động: LabChip GX Touch 24.
- Hệ thống tinh sạch nước tới 18MΩ: ELGA PureLab flex 2.

- Máy PCR: Thermo Fisher 2720.
- Máy chuẩn bị và xử lý mẫu trên chip bán dẫn: Ion Chef.
- Máy giải trình tự gen sử dụng chip bán dẫn: Ion Proton.
- Máy lắc, máy ly tâm đĩa vi tâm, giá đỡ có hoạt tính từ trường.
- Máy ly tâm MiniSpin, máy ly tâm cho chip bán dẫn (Ion Chip).
- Ống Cell-Free DNA BCT (Streck BCTs).

2.2.3.2. Hóa chất

- Hóa chất tách DNA tự do: Free Circulating DNA kit (Chemagen).
- Hóa chất phân tích kích thước và nồng độ DNA: DNA High Sensitivity Reagent Kit và LapChip DNA Extended Range (Perkin Elmer).
- Hóa chất đo nồng độ DNA chuỗi kép: Qubit dsDNA High Sensitivity Assay kit (Life Technologies).
- Hóa chất tinh sạch DNA sử dụng từ tính: AMPure XP kit (Beckman).
- Hóa chất chuẩn bị mẫu và nhân bản DNA: Ion Plus Fragment Library kit (Life Technologies).
- Hóa chất gắn barcode DNA vào mẫu: Ion Xpress Barcode Adaptors 1-16 kit (Life Technologies).
- Hóa chất chuẩn bị mẫu trên chip bán dẫn: Ion PI Hi-Q Chef kit (Life Technologies).
- Chip bán dẫn sử dụng cho quá trình giải trình tự: Ion PI Chip V3.

2.2.4. Các chỉ tiêu nghiên cứu

2.2.4.1. Đánh giá các đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

- Tuổi thai phụ (năm): tại thời điểm làm xét nghiệm NIPS, được chia thành các nhóm: 20 - 24, 25 - 29, 30 - 34, 35 - 39, ≥ 40 tuổi.
- Nghề nghiệp: cán bộ công chức, nông dân, nghề khác.

- Địa dư: Hà Nội và các vùng khác.

- Cân nặng thai phụ tại thời điểm làm xét nghiệm NIPS (kg), chiều cao thai phụ (cm), chỉ số khối cơ thể (BMI, đơn vị tính kg/m^2).

2.2.4.2. 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

Chỉ định thai phụ làm xét nghiệm NIPS

- Tuổi thai (tuần, ngày): dựa vào ngày đầu của kỳ kinh cuối hoặc theo siêu âm quý 1. Tuổi thai được phân làm 3 nhóm: 10 - 13 tuần 6 ngày, 14 - 20 tuần 6 ngày, ≥ 21 tuần.

- Yếu tố nguy cơ của thai phụ làm xét nghiệm NIPS:

+ Tuổi thai phụ ≥ 35 tuổi khi sinh.

+ Kết quả xét nghiệm CFTS và triple test: Thai phụ có nguy cơ cao mang thai lệch bội NST. Phần mềm FMF tính toán nguy cơ cho xét nghiệm CFTS, phần mềm TCSOFT PNS New cho xét nghiệm triple test:

* Nguy cơ cao (dương tính) với trisomy 21, 18, 13: Thai phụ có nguy cơ cao (dương tính) khi có từ một nguy cơ $\geq 1/250$ trở lên.

* Nguy cơ thấp (âm tính) với trisomy 21, 18, 13: Thai phụ có xét nghiệm sàng lọc nguy cơ thấp (âm tính) khi nguy cơ $< 1/250$. Tuy nhiên, không loại trừ hoàn toàn khả năng trẻ có thể bị dị tật bẩm sinh.

+ Siêu âm hình thái bất thường nghi ngờ có liên quan đến bất thường NST. Các bất thường siêu âm được đánh giá bởi các bác sỹ chuyên khoa chẩn đoán hình ảnh và sản phụ khoa có kinh nghiệm tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.

Các thông số của quy trình giải trình tự

- Đánh giá chất lượng tách DNA, tạo DNA thư viện đánh giá qua thông số:
- + Nồng độ DNA tự do (ng/ μ L).
- + Nồng độ DNA thư viện (ng/ μ L) và kích thước DNA thư viện (bp).
- Đánh giá chất lượng chip giải trình tự

DNA thư viện gắn lên bề mặt hạt ISP (Ion Sphere Particle) thông qua bước lai giữa P1 với adapter trên bề mặt hạt ISP (Ion Sphere Particle), sau đó được làm giàu trong môi trường emulsion PCR (ePCR) và nạp vào chip giải trình tự. Tùy thuộc vào nồng độ DNA thư viện được pha loãng mà có thể có hơn 1 loại DNA gắn lên bề mặt hạt ISP gây nên polyclonal, làm giảm số lượng giếng trên bề mặt của chip giải trình tự. Polyclonal càng cao, dữ liệu đầu ra của giải trình tự càng giảm. Do đó, DNA thư viện cần được pha loãng tới nồng độ tối ưu để polyclonal là thấp nhất. Ngoài ra, các trình tự DNA kém chất lượng (low quality), không xác định được tín hiệu của trình tự DNA chuẩn (key signal), adapter dimer (sự hình thành dimer giữa các adapter với nhau) cũng ảnh hưởng tới chất lượng hạt ISP.

Do đó hiệu quả của chip giải trình tự được đánh giá bằng các thông số như:

- + Mật độ hạt ISP được đánh giá bằng màu sắc biểu đồ nhiệt, mật độ hạt ISP nạp vào giếng (ISP loading) biểu hiện bằng tỷ lệ %, số lượng giếng chứa hạt ISP (triệu).

- + Dữ liệu kiểm tra chất lượng mẫu thể hiện bằng test fragment (TF-C và TF-1) đạt chất lượng.

- Đánh giá chất lượng hạt ISP qua các thông số: tỷ lệ (%) hạt ISP có trên 1 loại DNA (polyclonal), các trình tự kém chất lượng (low quality), hạt ISP đạt chất lượng hay trình tự DNA có thể sử dụng được (usable reads).

- Chất lượng giải trình tự

Toàn bộ trình tự đoạn đọc DNA được giống hàng, lập bản đồ và so sánh với trình tự chuẩn bộ gen người (hg19). Chất lượng giải trình tự được đánh giá qua các thông số:

+ Số lượng đoạn đọc DNA khớp (Aligned read).

+ Chiều dài đoạn đọc DNA (bp).

+ Độ gắn chính xác lên trình tự hg19 của các đoạn DNA được biểu thị bằng tỷ lệ chất lượng khớp (Alignment quality - AQ) với giá trị AQ17 (2% xảy ra lỗi) và AQ20 (1% xảy ra lỗi).

- Đánh giá kết quả giải trình tự:

+ Trình tự những đoạn đọc DNA bắt cặp chỉ với một vị trí trên bộ gen hg19 được coi là trình tự duy nhất (*Unique Reads* - URs). URs ≥ 2 triệu đoạn đọc DNA.

+ Dữ liệu giải trình tự (*Data Noise* - DN): Bình thường DN $< 3,5$; Mẫu thất bại không trả được kết quả khi DN $\geq 3,5$.

+ Nồng độ cffDNA (DNA thai tự do): Sử dụng thuật toán SeqFF (ước tính cffDNA (FF) dựa trên số lượng đoạn đọc DNA) được YOUNGENE ứng dụng tích hợp trong phần mềm phân tích tự động xác định nồng độ cffDNA. Thuật toán SeqFF sử dụng mô hình hồi quy đa biến nhằm ước tính nồng độ cffDNA bao gồm 2 mô hình hồi quy như mạng lưới đàn hồi (elastic net) và tiêu chuẩn chọn lựa thứ hạng (weighted rank selection criterion, WRSC). Đầu tiên, bộ gen được chia thành nhiều vùng (bin), mỗi vùng có kích thước 50kb, sau đó sử dụng mô hình hồi quy tuyến tính (weighted linear regression model) kết hợp đếm các đoạn đọc DNA trên tất cả các vùng của NST thường để dự đoán số lượng đoạn đọc cho NST Y (trong mô hình mạng lưới đàn hồi) hoặc số lượng

đoạn đọc DNA cho từng vùng riêng biệt trên NST Y (mô hình WRSC). Nồng độ cffDNA được ước tính là trung bình của của hai mô hình.

Bình thường nồng độ cffDNA $\geq 3,5\%$;

Xét nghiệm NIPS thất bại khi nồng độ cffDNA $< 3,5\%$.

+ Điểm z-score (Z) sử dụng để đánh giá nguy cơ lệch bội NST: điểm z-score được tính trên một phần của tổng số dữ liệu thu thập được (ví dụ 0,15% đối với NST 21). Ý tưởng cơ bản của phương pháp tiếp cận điểm z-score là sau khi giải trình tự, hàng triệu các đoạn DNA ngắn sẽ được lập bản đồ so sánh với trình tự DNA tham chiếu để xác định nguồn gốc từng NST. Kết quả của từng thai phụ sau đó có thể được so sánh với dữ liệu tham khảo này, và điểm z-score có thể được tính cho mỗi NST.

Công thức tính điểm z-score:

$$\mathbf{Z\text{-score}_{m\grave{a}u} = (P_{m\grave{a}u} - P_{mean\ m\grave{a}u\ tham\ chi\grave{e}u}) / SD_{mean\ m\grave{a}u\ tham\ chi\grave{e}u}}$$

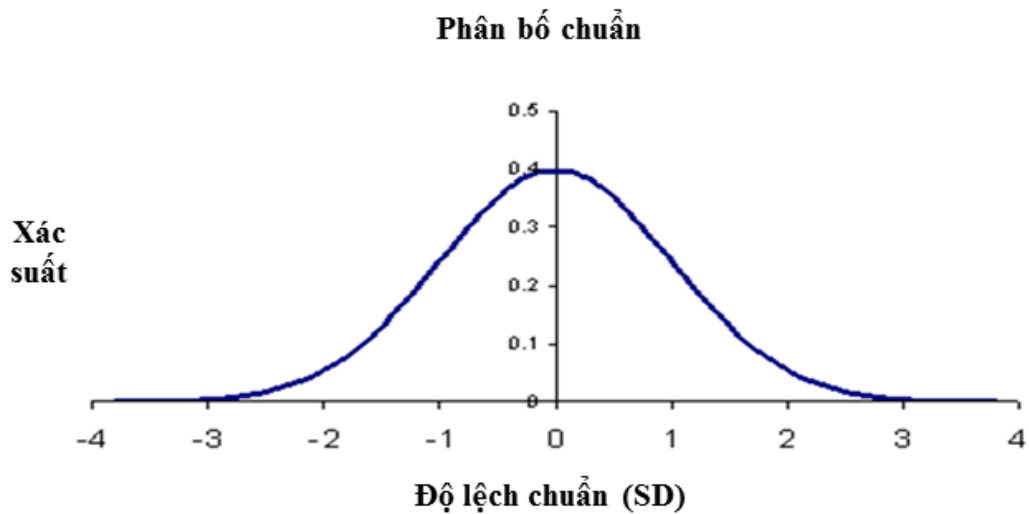
(P = tỷ lệ của NST quan tâm; SD = độ lệch chuẩn - standard deviation)

Trong công thức trên, điểm z-score được tính cho một NST (A), $P_{m\grave{a}u}$ là phần dữ liệu đọc mà khớp được vào NST A tại lần giải trình tự đó, P_{mean} là dữ liệu đọc được và khớp vào NST A trong cơ sở dữ liệu tham chiếu. SD là độ lệch tiêu chuẩn của NST A. Trong trường hợp lệch bội NST, thêm hoặc bớt tương đối của NST lệch bội so với NST lưỡng bội, điểm z-score của NST khảo sát sẽ lệch khỏi giá trị trung bình đo được trong các lần mang thai bình thường biểu hiện bằng biểu đồ phân bố chuẩn (hình 2.4). Như vậy, nếu nồng độ cffDNA thấp thì sự khác biệt giữa P và SD quá nhỏ để có được một điểm z-score có ý nghĩa, chính vì vậy có thể dẫn đến một kết quả âm tính giả [54].

- Kết quả xét nghiệm NIPS âm tính với lệch bội NST: $-3 < z\text{-score} < 3$.

- Kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với trisomy: $z\text{-core} \geq 3$.

- Kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với monosomy: $z\text{-core} \leq -3$.



Hình 2.1. Biểu đồ phân bố chuẩn của điểm z-score

2.2.4.3. *Đánh giá giá trị của phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới sử dụng DNA thai tự do trong máu mẹ.*

- Sử dụng xét nghiệm NST đồ (karyotype) phân tích bộ NST từ dịch ối để đánh giá giá trị của phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới. NST được phân tích theo hệ thống danh pháp quốc tế về di truyền người ISCN 2016 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) [90]:

+ Phân tích trên kính hiển vi với độ phóng đại 1000 lần. Các cụm NST đủ tiêu chuẩn phân tích là những cụm có NST phân tán tốt, không chồng lên nhau, còn nền bào tương, kích thước NST không quá ngắn, băng rõ.

+ Các cụm NST được phân tích về số lượng và cấu trúc, đánh giá NST bình thường hay đột biến:

Đột biến số lượng: Khi cụm phân tích có nhiều hoặc ít hơn 46 NST.

Đột biến cấu trúc: Đảo đoạn, chuyển đoạn, nhân đoạn, mất đoạn, NST vòng, NST hai tâm...

Mỗi mẫu được phân tích 30 cụm NST ở kỳ giữa và lập karyotype ≥ 5 cụm. Những trường hợp khám, phân tích 100 cụm NST.

- Đánh giá giá trị của của phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới bằng các thông số: Độ nhạy (Se - Sensitivity) hay tỷ lệ phát hiện (detection rate - DR), độ đặc hiệu (Sp - Specificity), giá trị tiên đoán dương tính (PPV - Positive predictive value) và giá trị tiên đoán âm tính (NPV - Negative predictive value).

2.2.5. Quy trình nghiên cứu

- Thai phụ có chỉ định làm xét nghiệm NIPS sẽ được phỏng vấn để thu thập thông tin về đặc điểm cá nhân, tiền sử phụ khoa và tiền sử mắc các bệnh trong tiêu chuẩn loại trừ đã nêu ở trên.

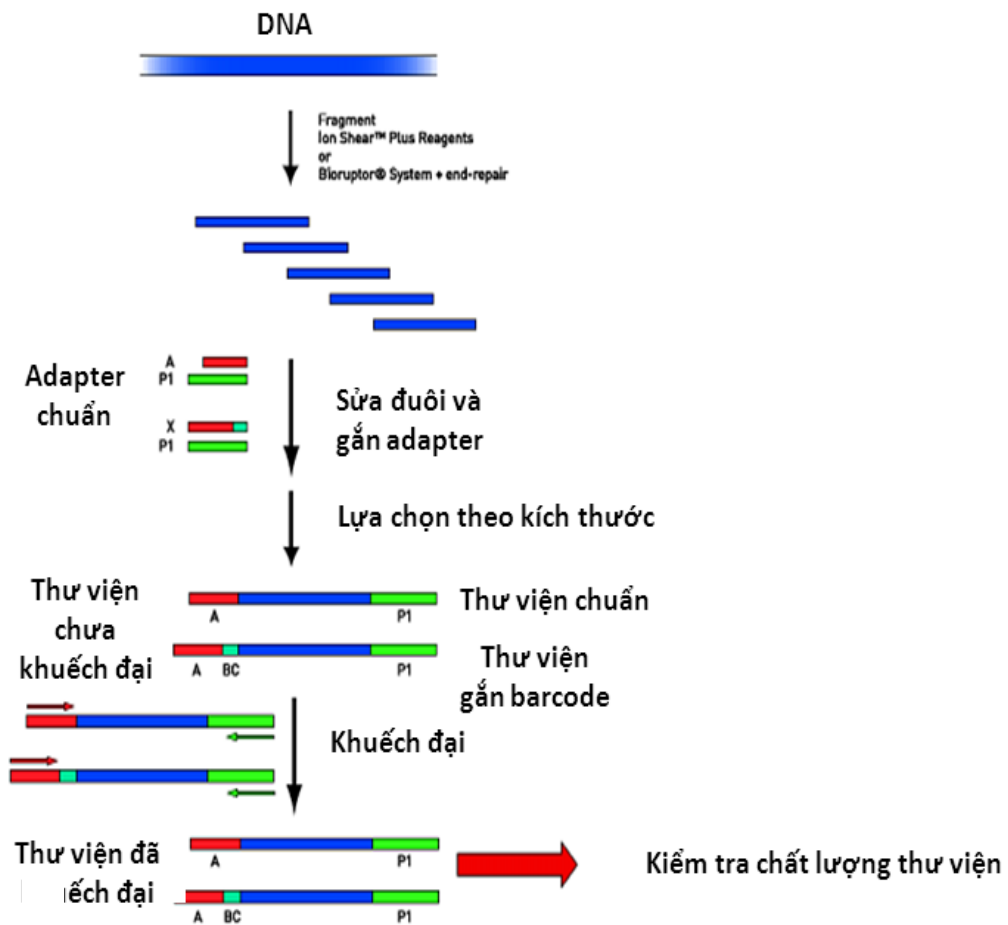
- Thu thập các thông tin xét nghiệm sàng lọc trước sinh kết hợp thai kỳ 1 (CFTS), triple test và siêu âm hình thái, phân loại nhóm thai phụ về đặc điểm ngưỡng nguy cơ sàng lọc, đặc điểm siêu âm hình thái (phụ lục 5).

- Thu thập 10mL mẫu máu toàn phần thai phụ vào ống chuyên dụng Streck BCTs và bảo quản mẫu ở nhiệt độ phòng, tối đa trong vòng 14 ngày (phụ lục 1). Tách huyết tương, sau đó tách DNA tự do từ mẫu máu toàn phần. DNA tự do sẽ được tạo thư viện, chuẩn bị mẫu thư viện, sau đó giải trình tự trên hệ thống giải trình tự gen thế hệ mới Ion Torrent để xác định nguy cơ lệch bội NST 13, 18, 21 và NST giới tính cụ thể như sau:

- + Quy trình lấy mẫu máu thai phụ (phụ lục 1).
- + Quy trình tách huyết tương. Mẫu huyết tương sau khi tách có thể lưu trong vòng 6 tháng tại -80°C (phụ lục 2.1).
- + Quy trình tách DNA tự do bằng máy tách DNA tự động sử dụng hóa chất tách DNA tự do trong huyết tương (phụ lục 2.2).
- + Quy trình đo nồng độ DNA tự do bằng máy quang phổ phân tích chuỗi DNA kép và hóa chất đo nồng độ DNA (phụ lục 2.3).

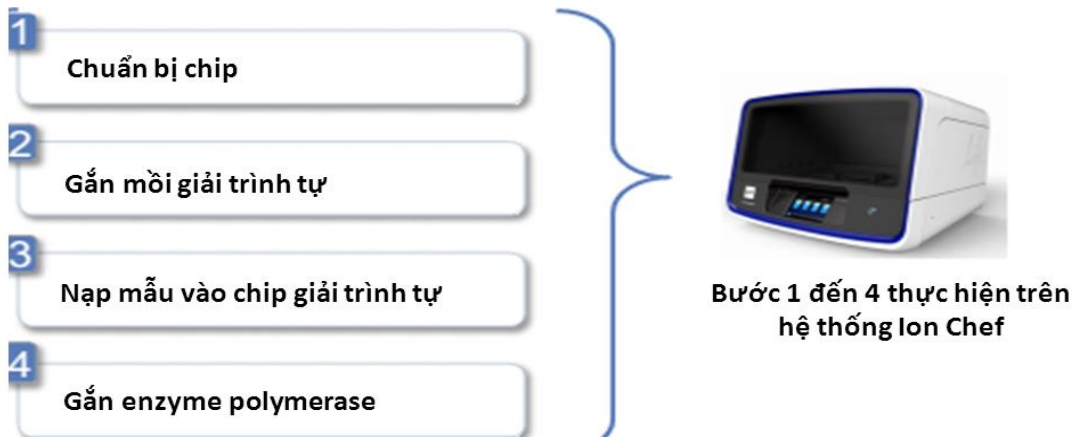
+ Quy trình tạo thư viện sử dụng hóa chất Ion Plus Fragment Library (phụ lục 2.4) gồm 5 bước chính:

- Sửa đuôi và tinh sạch DNA tự do.
- Nối các đoạn Adapters và tinh sạch DNA tự do đã được nối.
- Nhân bản và tinh sạch DNA thư viện tự do.
- Đo nồng độ DNA thư viện tự do
- Kiểm tra chất lượng DNA thư viện.
- Định lượng DNA thư viện và tạo hỗn hợp DNA đồng nồng độ: Pha loãng các DNA thư viện đã được gắn mã vạch xuống 55pM để đưa mẫu vào máy chuẩn bị mẫu Ion Chef.



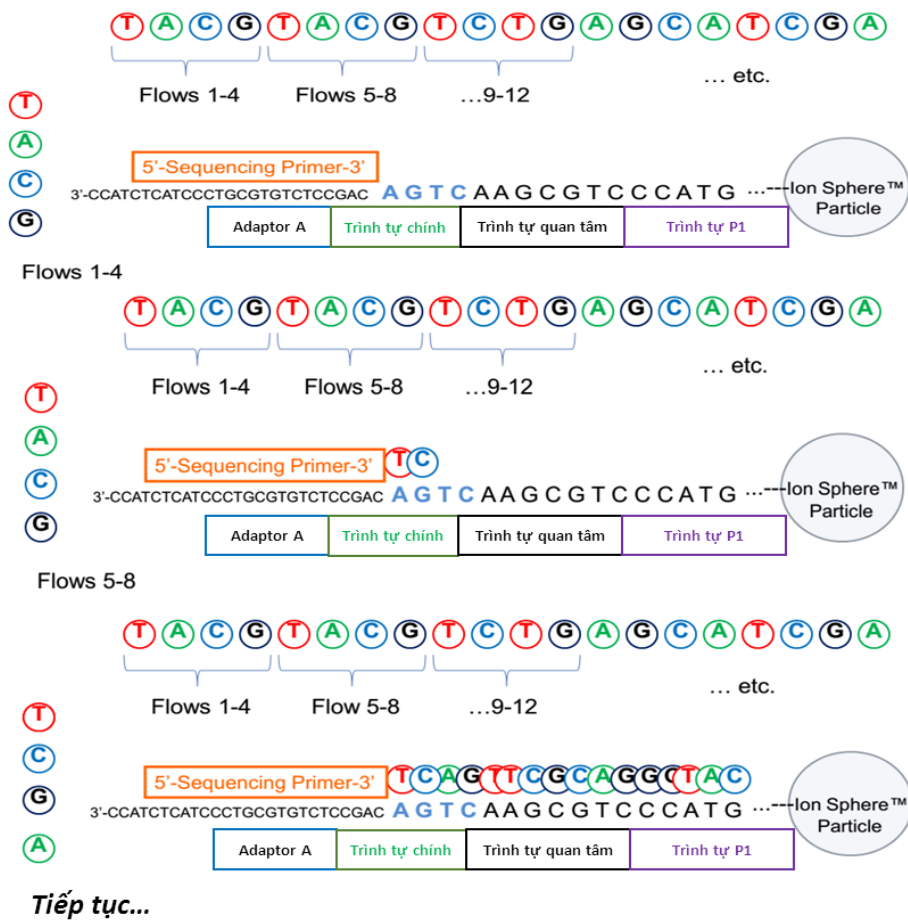
Hình 2.2. Quy trình tạo DNA thư viện

+ Quy trình chuẩn bị mẫu DNA thư viện trên máy Ion Chef (phụ lục 2.5.1)



Hình 2.3. Các bước chính chuẩn bị mẫu DNA thư viện trên Ion Chef

+ Giải trình tự trên máy Proton (phụ lục 2.5.2).



Tiếp tục...

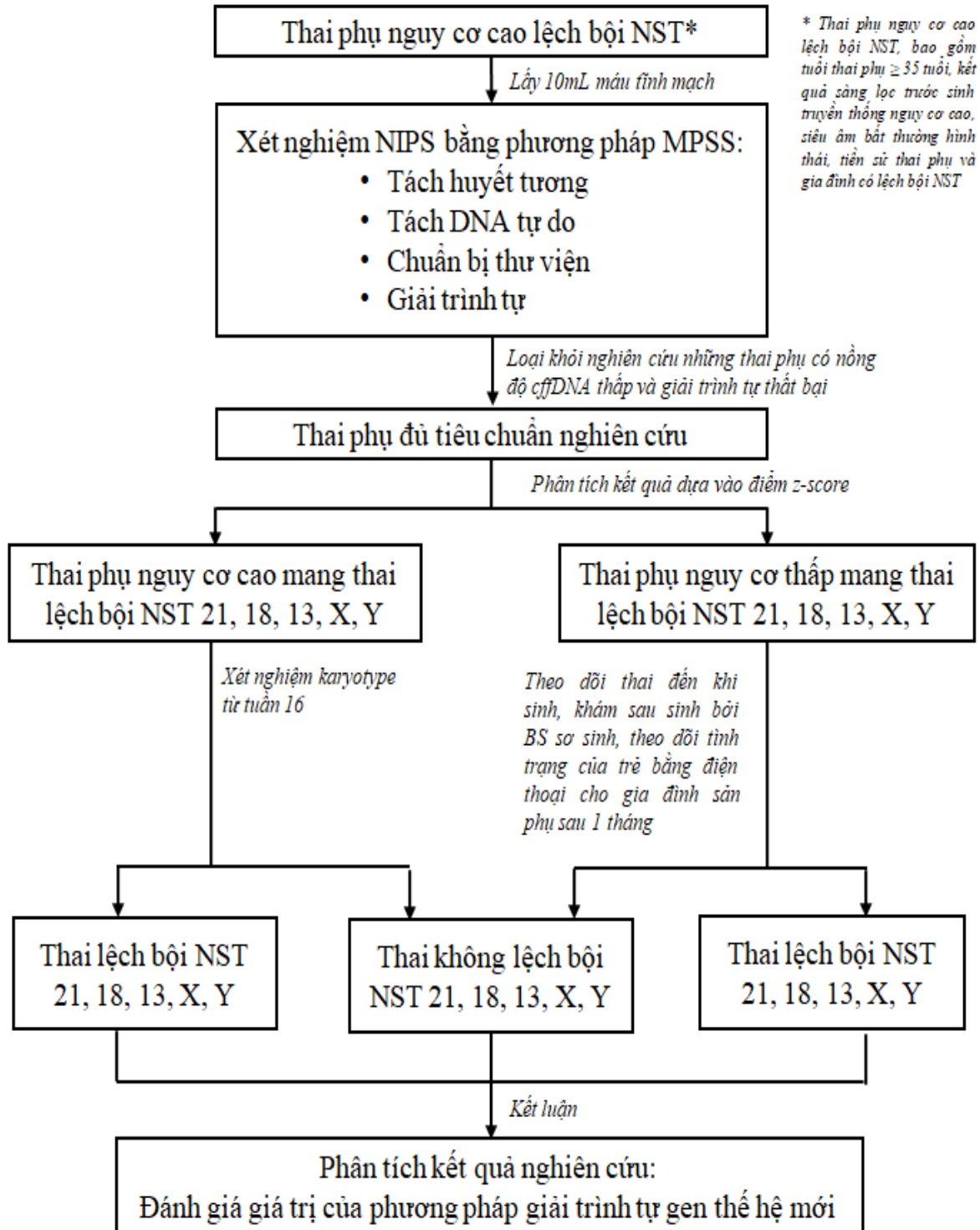
Hình 2.4. Giải trình tự trên máy Ion Proton

+ 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 nồng độ cffDNA trên mỗi mẫu và điểm z-score cho từng NST.

+ Chẩn đoán xác định đối với thai phụ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính: Chỉ định thủ thuật hút dịch ối khi thai phụ mang thai ≥ 16 tuần thai, nuôi cấy tế bào, lập karyotype 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 (phụ lục 3 - 4).

+ Theo dõi thai đối với thai phụ kết quả xét nghiệm 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 cách điện thoại cho sản phụ và gia đình vào thời điểm 1 tháng sau sinh.

2.3. Sơ đồ nghiên cứu



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu:
 - + Trung tâm Sàng lọc, Chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.
 - + Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội.
- Thời gian nghiên cứu: Từ năm 2016 đến năm 2019.

2.5. Phương pháp tính toán và 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 $p < 0,05$.
- Đánh giá giá trị của của phương pháp sàng lọc NIPS bằng các thông số: Độ nhạy (Se - Sensitivity) hay tỷ lệ phát hiện (detection rate - DR), độ đặc hiệu (Sp - Specificity), giá trị tiên đoán dương tính (PPV - Positive predictive value) và giá trị tiên đoán âm tính (NPV - Negative predictive value) với cách tính như sau:

Bảng 2.1. Đánh giá kết quả xét nghiệm NIPS

Karyotype NIPS	Có bệnh	Không bệnh	Tổng
Dương tính	a	b	a+b
Âm tính	c	d	c+d
Tổng số	a+c	b+d	a+b+c+d

$Se = a/a+c$ (số dương tính thật trong nhóm có bệnh)

$Sp = d/b+d$ (Số âm tính thật trong nhóm không bệnh)

$PPV = a/a+b$ (Số bị bệnh trong nhóm dương tính)

$NPV = d/c+d$ (Số không bị bệnh trong nhóm âm tính)

2.6. Đạo đức trong nghiên cứu

- Nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức của Bệnh viện Phụ sản Hà Nội theo quyết định số 09/PSHN - HĐĐĐ.
- Các đối tượng tham gia nghiên cứu là hoàn toàn tự nguyện và có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia nghiên cứu.
- Các thông tin liên quan đến bệnh nhân được đảm bảo bí mật.
- Các kỹ thuật, thao tác liên quan đến bệnh nhân được bảo đảm đúng chuyên môn.
- Bệnh nhân không phải trả tiền thủ thuật xâm lấn, xét nghiệm karyotype trong trường hợp kết quả NIPS dương tính.
- Đề tài nghiên cứu này được thực hiện hoàn toàn vì mục đích khoa học không vì mục đích nào khác.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong thời gian từ năm 2016 đến năm 2019, nghiên cứu đã thực hiện xét nghiệm NIPS trên 1249 thai phụ nguy cơ cao mang thai lệch bội NST bằng hệ thống giải trình gen tự thể hệ mới tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội. Sau giải trình tự, 18 thai phụ có nồng độ cffDNA thấp và giải trình tự thất bại bị loại khỏi nghiên cứu, 1231 thai phụ đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn và đồng ý tham gia nghiên cứu.

3.1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

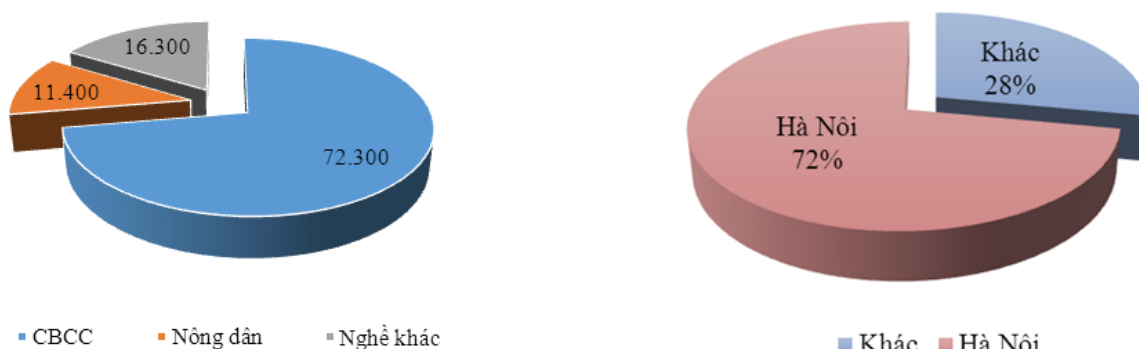
3.1.1. Phân bố tuổi thai phụ trong nghiên cứu

Bảng 3.1. Đặc điểm tuổi thai phụ trong nghiên cứu

Tuổi thai phụ (năm)	Số lượng	
	n	%
≤ 19	4	0,32
20- 24	55	4,47
25- 29	225	18,28
30- 34	253	20,55
35- 39	475	38,59
≥ 40	219	17,79
Tổng	1231	100,0
$\bar{x} \pm SD$ (năm)	34,3 ± 5,7	
Min - Max (năm)	17 - 47	
95% CI	34,01 - 34,63	

Tổng số 1231 thai phụ đến làm xét nghiệm NIPS có tuổi dao động trong khoảng 17 - 47 tuổi, tuổi trung bình là $34,3 \pm 5,7$ tuổi. Trong đó nhóm tuổi từ 35 - 39 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất 38,59%, tiếp theo là nhóm tuổi từ 30 - 34 tuổi chiếm tỷ lệ 20,55%, nhóm tuổi từ 25 - 29 tuổi chiếm 18,28%, nhóm tuổi ≥ 40 tuổi chiếm 17,79%, nhóm tuổi ≤ 19 tuổi chiếm tỷ lệ thấp nhất là 0,32%.

3.1.2. Phân bố theo nghề nghiệp và địa dư



Biểu đồ 3.1. Phân bố theo nghề nghiệp và địa dư

Các thai phụ làm xét nghiệm NIPS có nghề nghiệp là cán bộ công chức chiếm tỷ lệ cao nhất 72,3%. Tiếp theo là các nghề khác chiếm tỷ lệ 16,3% và thấp nhất là nông dân chiếm tỷ lệ 11,4%. Các thai phụ làm xét nghiệm NIPS đến từ Hà Nội có tỷ lệ cao nhất chiếm 72,0%, các vùng khác chiếm tỷ lệ thấp hơn là 28%.

3.1.3. Đặc điểm cân nặng nhóm thai phụ làm xét nghiệm NIPS

Bảng 3.2. Đặc điểm cân nặng nhóm thai phụ làm xét nghiệm NIPS

Đặc điểm	n	$\bar{x} \pm SD$	95% CI	Min - Max
Cân nặng (kg)	1231	$53,59 \pm 6,55$	53,22 - 53,96	31 - 90
Chiều cao (cm)	1231	$155,37 \pm 4,54$	155,12 - 155,62	140 - 172
BMI (kg/m^2)	1231	$21,19 \pm 2,47$	22,05 - 22,33	15 - 33,4

Ghi chú: BMI: Chỉ số khối lượng cơ thể; 95% CI: khoảng tin cậy 95%.

Cân nặng của thai phụ dao động trong khoảng 31 - 90kg, trung bình là $53,59 \pm 6,55\text{kg}$ (95% CI: 53,22 - 53,96kg). Chỉ số khối cơ thể (BMI) của thai phụ dao động từ 15 - 33,4 kg/m^2 , trung bình là $21,19 \pm 2,47 \text{kg}/\text{m}^2$ (95% CI: 22,05 - 22,33).

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

3.2.1. Chỉ định thai phụ làm xét nghiệm NIPS

3.2.1.1. Tuổi thai tại thời điểm làm xét nghiệm NIPS

Bảng 3.3. Tuổi thai tại thời điểm làm xét nghiệm NIPS

Tuổi thai (tuần, ngày)	Số lượng	
	n	%
10-13 tuần 6 ngày	468	38,02
14-20 tuần 6 ngày	704	57,19
≥ 21 tuần	59	4,79
Tổng	1231	100,0
$\bar{X} \pm SD$ (tuần)	15,2±3,1	
Min - Max (tuần, ngày)	10,0-30,3	
95% CI (tuần, ngày)	15,05-15,39	

Thai phụ có tuổi thai từ 10 - 30 tuần 3 ngày, tuổi thai trung bình là 15,2 ± 3,1 tuần (95% CI, 15,05 - 15,39 tuần). Trong đó, tuổi thai từ 14 - 20 tuần 6 ngày chiếm tỷ lệ cao nhất là 57,19%, tuổi thai từ 10 - 13 tuần 6 ngày chiếm 38,02%, tuổi thai ≥ 21 tuần chiếm tỷ lệ thấp nhất 4,79%.

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

Bảng 3.4. 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	56,38
Siêu âm bất thường	123	1231	10,0
Sàng lọc huyết thanh nguy cơ cao	814	1231	66,13
Tiền sử thai phụ hoặc gia đình	95	1231	7,72
Có hơn 1 yếu tố nguy cơ	467	1231	37,93

1231 thai phụ có các yếu tố nguy cơ cao được chỉ định làm xét nghiệm NIPS. Trong đó, sàng lọc bằng huyết thanh mẹ nguy cơ cao với trisomy 21, 18, 13 chiếm tỷ lệ cao nhất là 66,13% (814/1231), tiếp theo là nhóm thai phụ tuổi ≥ 35 tuổi chiếm tỷ lệ 56,38% (694/1231), thai phụ có kết quả siêu âm bất thường chiếm tỷ lệ 10,0% (123/1231). 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 7,72% (95/1231).

3.2.2. Kết quả giải trình tự

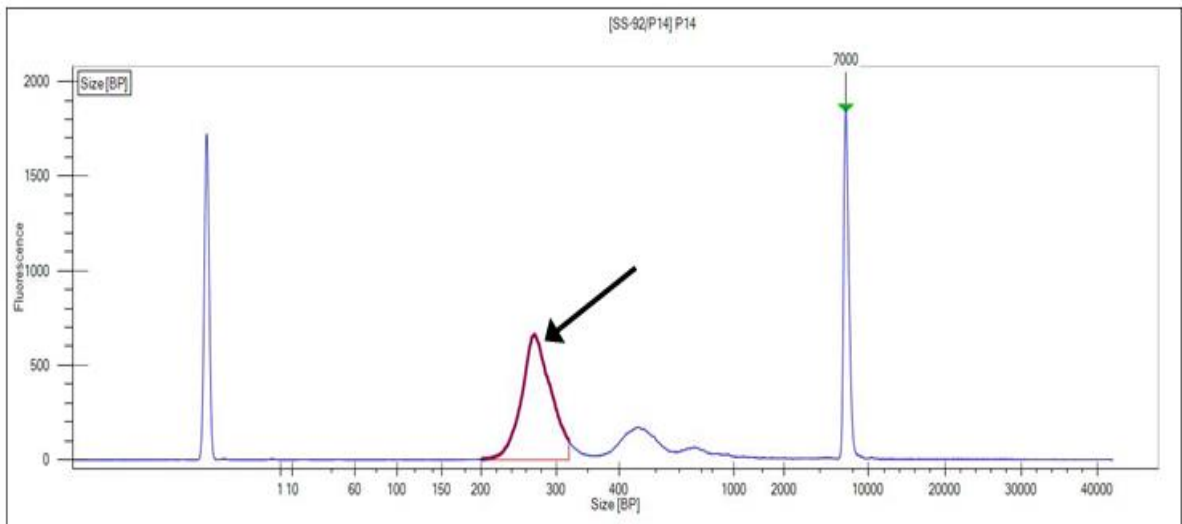
3.2.2.1. Kết quả tách DNA tự do và tạo DNA thư viện

Bảng 3.5. Nồng độ DNA tự do và nồng độ DNA thư viện

Nồng độ (ng/μL)	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 thu được từ hệ thống tách DNA tự động 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 DNA thư viện 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.

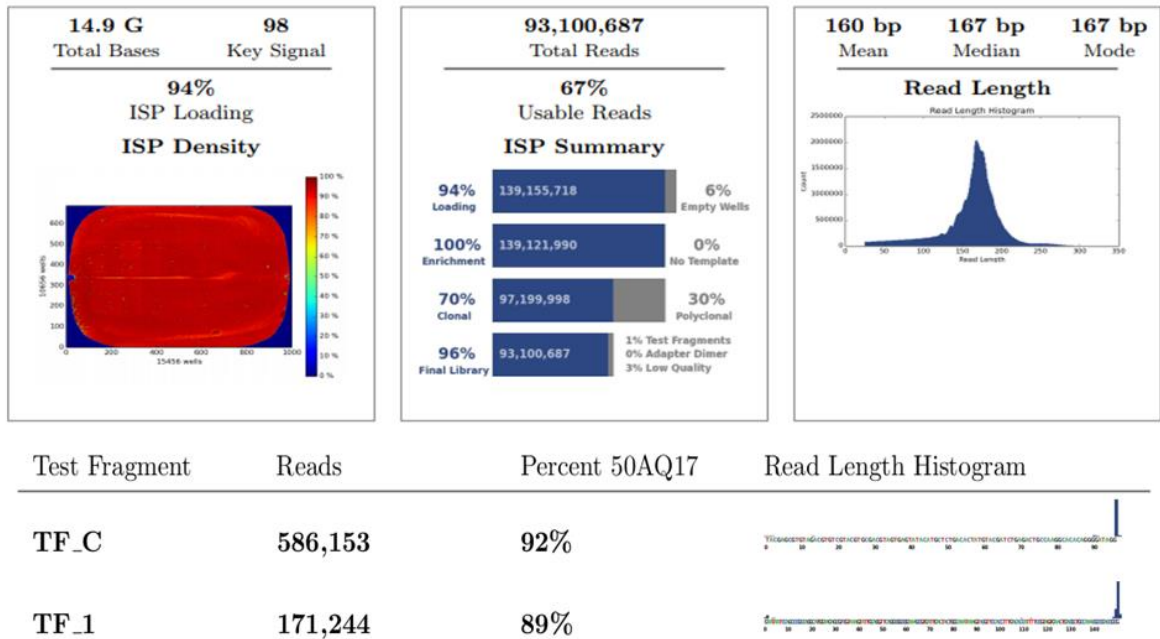
Well Label	Sample Name	Type	Size [BP]	Conc. (ng/ul)	% Purity	Molarity (nmol/L)
F03	F03	LM		1.00		
F03	F03		266	0.27	36.89	1.55
F03	F03		271	0.31	41.96	1.72
F03	F03		389	0.00	0.50	0.01
F03	F03		401	0.01	1.83	0.05
F03	F03		426	0.03	3.86	0.10
F03	F03		438	0.02	2.89	0.07
F03	F03		459	0.02	3.27	0.08
F03	F03		473	0.02	3.27	0.08
F03	F03		492	0.02	2.71	0.06
F03	F03		637	0.01	1.03	0.02
F03	F03		687	0.01	0.84	0.01
F03	F03		876	0.00	0.49	0.01



Hình 3.1. Kết quả kiểm tra chất lượng DNA thư viện

DNA thư viện được kiểm tra kích thước và nồng độ bằng hệ thống điện di mao quản LabChip (hình 3.1) trong các lần giải trình tự cho thấy kích thước DNA thư viện trong huyết tương phân bố trong khoảng 266 - 271bp (chúng tỏ đã được gắn adaptor và barcode) với nồng độ 1,55 - 1,72nmol/L, thư viện có kích thước không đạt chiếm tỷ lệ thấp được loại bỏ qua bước tinh sạch DNA thư viện.

3.2.2.2. Kết quả chất lượng giải trình tự



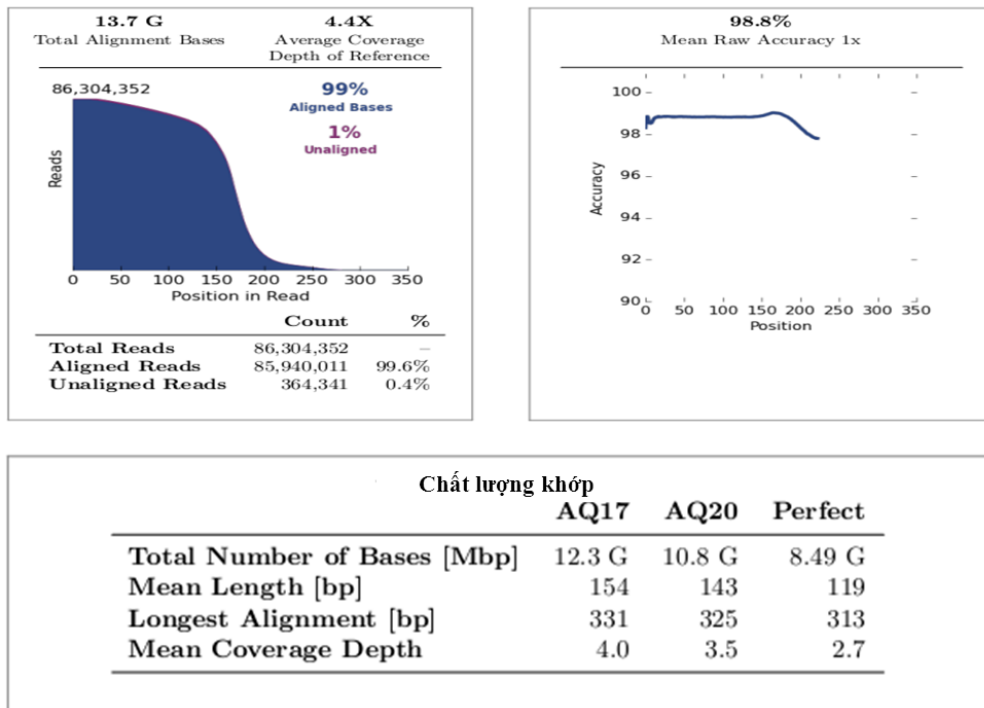
Hình 3.2. Hiệu quả nạp mẫu vào chip giải trình tự

Hình 3.2 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. Dữ liệu kiểm tra chất lượng thể hiện bằng test fragment (nội kiểm TF-C và TF-1) đều đạt chất lượng.

Bảng 3.6. 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 $13,3 \pm 6,9\text{Gb}$ (95% CI, 12,1 - 14,9). Mật độ hạt ISP nạp vào các giếng dao động từ 72,0 - 94,0%, trung bình đạt $88,5 \pm 4,8\%$ (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 $60,6 \pm 5,8\%$, dao động trong khoảng 40,0 - 69,0%, tương đương khoảng $78,9 \pm 10,8$ triệu giếng hay số lượng đoạn đọc DNA.



Hình 3.3. Chất lượng khớp của đoạn đọc với trình tự hg19

Kết quả độ chính xác theo kích thước của các đoạn đọc DNA khi gắn vào trình tự chuẩn hg19 (mean raw accuracy). Trong đó, các đoạn đọc DNA có kích thước ngắn sẽ có điểm chính xác gắn cao. Điểm chính xác tiếp tục duy trì đối với đoạn đọc DNA có độ dài < 180bp (98,8%). Các đoạn đọc có kích thước lớn hơn thì độ chính xác giảm dần.

Bảng 3.7. Chất lượng khớp của đoạn đọc với trình tự hg19

Đặc điểm	n (chip)	$\bar{x} \pm SD$	Min-Max	95% CI
Chiều dài DNA (bp)	115	160,5±3,1	148-168	160-161,2
Số lượng DNA khớp (triệu)	115	74,6±12,5	43,8-90,2	72,3-74,6
Số lượng DNA khớp (G)	115	12±1,8	6,8-14,5	11,8-12,5
AQ17 (G)	115	10,8±1,6	6,2-13	10,6-11,2
AQ 20 (G)	115	9,5±1,5	5,4-14,1	9,4-9,9

Chiều dài trung bình đoạn đọc DNA khoảng $160,5 \pm 3,1$ bp. Trung bình $74,6 \pm 12,5$ triệu số lượng đoạn đọc DNA khớp được với trình tự hg19 (Aligned read), dao động từ 43,8 - 90,2 triệu (95% CI, 72,3- 74,6 triệu). Trong tổng số đoạn đọc DNA có khả năng khớp vào hg19 (Alignment bases) là $12 \pm 1,8$ G thì tỷ lệ số lượng đoạn đọc DNA đạt chất lượng AQ17 (2% xảy ra lỗi) đạt 90% ($10,8/12$ G) còn AQ20 (1% xảy ra lỗi) là 79,2% ($9,5/12$ G).

3.2.2.3. Tỷ lệ thất bại và thành công của xét nghiệm NIPS

Bảng 3.8. Tỷ lệ thành công của xét nghiệm NIPS

Kết quả giải trình tự	Lần 1		Lần 2		Chung	
	n	%	n	%	n	%
Thành công	1194	95,6	37	67,3	1231	98,56
Thất bại	55	4,4	18	32,7	18	1,44
Tổng	1249	100,0	55	100,0	1249	100,0

Trong số 1249 mẫu, sau giải trình tự lần 1 có 95,6% mẫu thành công (1194/1249 mẫu), 4,4% mẫu thất bại (55/1249 mẫu). Kết quả giải trình tự lần 2 có 67,3% mẫu giải trình tự thành công (37/55 mẫu), 32,7% mẫu thất bại (18/55 mẫu). Do vậy số lượng mẫu giải trình tự thành công trong nghiên cứu là 1231 mẫu chiếm tỷ lệ 98,56% (1231/1249).

Bảng 3.9. 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 sau 7-10 ngày, giải trình tự 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 $\geq 3,5$) chiếm tỷ lệ 0,08%. Mẫu có nồng độ cffDNA thấp và giải trình tự thất bại sau giải trình tự lần 2 sẽ được tư vấn thực hiện các phương pháp sàng lọc khác hoặc chẩn đoán xâm lấn.

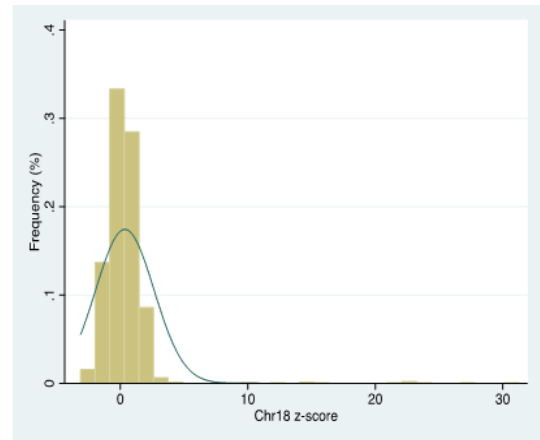
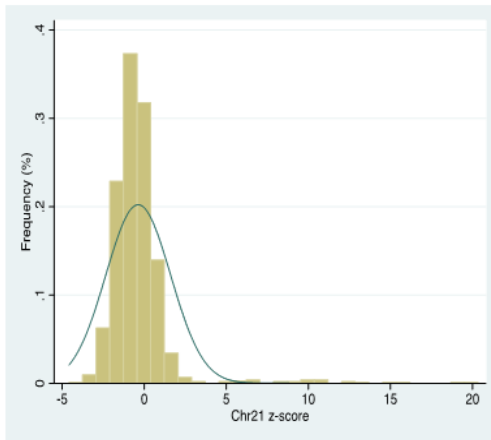
3.2.2.4. Kết quả giải trình tự

Bảng 3.10. Kết quả giải trình tự

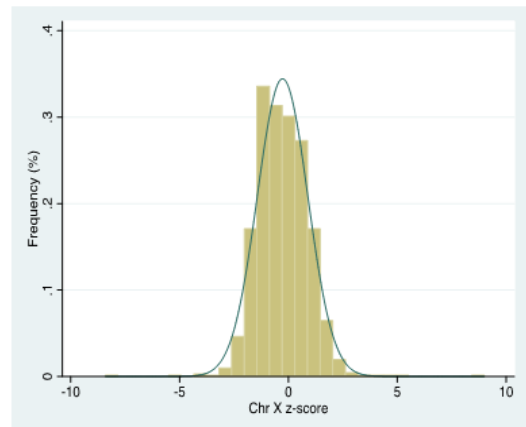
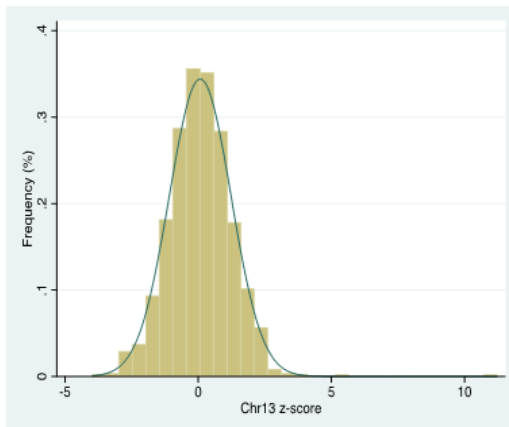
Đặc điểm	$\bar{X} \pm SD$ (n=1231)	Min - Max	95% CI
Nồng độ cffDNA (%)	7,79 \pm 3,04	3,51-24,59	7,62-7,96
URs (triệu)	4,4 \pm 1,1	2,0 \pm 17,7	4,3 \pm 4,5
DN (dữ liệu nhiễu)	0,38 \pm 1,09	(-2,31)-3,47	0,32-0,44

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 \pm 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).

3.2.2.5. Phân bố z-score NST 21, 18, 13, X



Biểu đồ 3.2. Phân bố z-score NST 21 **Biểu đồ 3.3. Phân bố z-score NST 18**



Biểu đồ 3.4. Phân bố z-score NST 13 **Biểu đồ 3.5. Phân bố z-score NST X**

Phân bố điểm z-score trên 1231 mẫu của các NST 21, 18, 13 và NST X đều là phân bố chuẩn. Kết quả xét nghiệm NIPS nguy cơ thấp hoặc âm tính với trisomy khi $-3 < z\text{-score} < 3$. Kết quả xét nghiệm NIPS nguy cơ cao hoặc dương tính với trisomy: $z\text{-score} \geq 3$. Kết quả xét nghiệm NIPS nguy cơ cao hoặc dương tính với monosomy: $z\text{-score} \leq -3$.

Bảng 3.11. Kết quả điểm z-score NST 21, 18, 13, X

Loại NST z-score	NST 21	NST 18	NST 13	NST X
Không lệch bội (max) (n=1172)	2,57	2,8	2,77	2,9
Không lệch bội (min) (n=1172)	-4,59	-3,12	-3,99	-2,9
Lệch bội (max) (n=59)	20,34	31,26	11,22	9,963
Lệch bội (min) (n=59)	3,19	3,53	3,22	-8,41

Kết quả giải trình tự cho thấy có 1172 mẫu không phát hiện lệch bội và 59 mẫu phát hiện lệch bội NST, trong đó điểm z-score NST 13 dao động từ -3,99 đến 2,77. Điểm z-score trisomy 13 (n = 5) dao động từ 3,22 đến 11,22. Điểm z-score của NST 18 dao động từ -3,12 đến 2,8. Điểm z-score trisomy 18 (n = 15) dao động từ 3,53 đến 31,26. Điểm z-score NST 21 dao động từ -4,59 đến 2,57. Điểm z-score trisomy 21 (n = 30) dao động từ 3,19 đến 20,34. Điểm z-score của NST X dao động từ -2,9 đến 2,9, trong đó 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).

3.3. 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. Kết quả xét nghiệm NIPS

Bảng 3.12. Tỷ lệ lệch bội NST trong xét nghiệm NIPS

Kết quả NIPS	Số lượng	
	n	%
Âm tính	1172	95,21
Dương tính	59	4,79
Tổng	1231	100,0

Trên 1231 thai phụ nguy cơ cao lệch bội NST phát hiện 59 thai phụ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 4,79% (59/1231). 1172 thai phụ có kết quả xét nghiệm NIPS nguy cơ thấp chiếm tỷ lệ 95,21% (1172/1231).

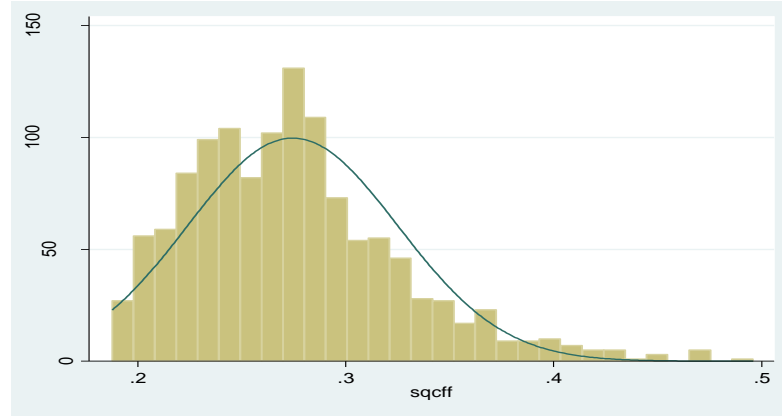
Bảng 3.13. Phân loại lệch bội NST với xét nghiệm NIPS dương tính

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	59	100,0

59 mẫu xét nghiệm NIPS dương tính với lệch bội NST thai, trong đó 30 mẫu xét nghiệm NIPS 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 01 mẫu dương tính với monosomy X chiếm tỷ lệ 6,8%; 03 mẫu dương tính với 47,XXY chiếm tỷ lệ 5,1%; 01 mẫu dương tính với 47,XYY chiếm tỷ lệ 1,7% và 01 mẫu dương tính với 47,XXX chiếm tỷ lệ 1,7%).

3.3.2. Phân tích giá trị của nồng độ cffDNA trong xét nghiệm NIPS

3.3.2.1. Nồng độ cffDNA trong nghiên cứu



Biểu đồ 3.6. Phân bố nồng độ cffDNA

Kết quả giải trình tự của 1231 mẫu cho thấy nồng độ cffDNA là phân bố chuẩn.

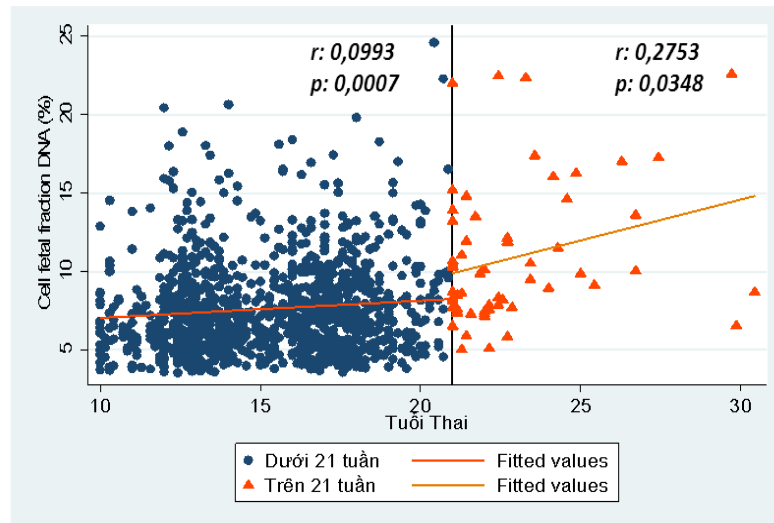
3.3.2.2. Mối tương quan giữa nồng độ cffDNA và tuổi thai

Bảng 3.14. Nồng độ cffDNA và tuổi thai

Tuổi thai	n	cff DNA (%) ($\bar{x} \pm SD$)	p^{1-2}	p^{1-3}	p^{2-3}
10 - 13 tuần 6 ngày (1)	468	7,44 ± 2,81	0,212	0,000	0,000
14 - 20 tuần 6 ngày (2)	704	7,76 ± 2,91			
≥ 21 tuần (3)	59	10,85 ± 4,45			
Tổng	1231	7,79 ± 3,04			

(Kiểm định ANOVA một chiều có hiệu chỉnh Bonferoni)

Nồng độ cffDNA trung bình trong nghiên cứu là $7,79 \pm 3,04\%$. Nhận thấy nồng độ cffDNA có xu hướng tăng dần theo tuổi thai, nồng độ cffDNA ở nhóm tuổi thai từ 10 - 13 tuần 6 ngày thấp hơn so với nhóm tuổi thai từ 14 - 20 tuần 6 ngày, tuy nhiên không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm, $p = 0,212$. Nhóm thai phụ có tuổi thai từ 10 - 13 tuần 6 ngày và nhóm thai phụ có tuổi thai từ 14 - 20 tuần 6 ngày có nồng độ cffDNA thấp hơn hẳn so với nhóm tuổi thai ≥ 21 tuần, tìm thấy sự khác biệt nồng độ cffDNA có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm, $p = 0,000$.



Biểu đồ 3.7. Nồng độ cffDNA và tuổi thai

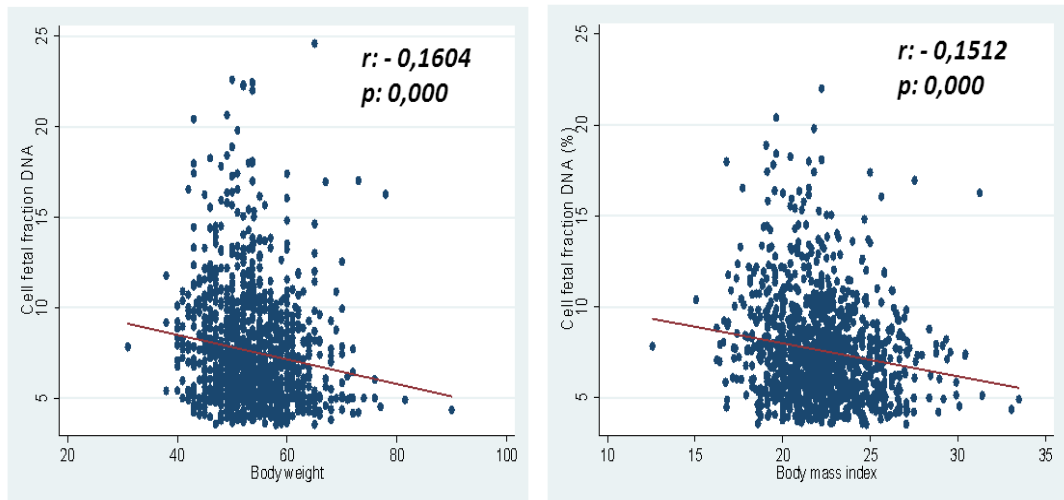
Nồng độ cffDNA tăng nhẹ ở nhóm thai phụ có tuổi thai từ 10 - 20 tuần 6 ngày, tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và tuổi thai từ 10 - 20 tuần 6 ngày, $p = 0,0007$. Nhóm thai phụ có tuổi thai ≥ 21 tuần, nồng độ cffDNA tỷ lệ thuận với tuổi thai, nồng độ cffDNA tăng nhanh theo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

3.3.2.3. Mối tương quan giữa nồng độ cffDNA và cân nặng, BMI

Bảng 3.15. Nồng độ cffDNA và cân nặng thai phụ

Cân nặng (kg)	n	cff DNA % ($\bar{X} \pm SD$)	95% CI
< 60	1000	7,89 \pm 3,07	7,70-8,09
≥ 60	231	7,30 \pm 2,89	6,93-7,68
Tổng số	1231	7,79 \pm 3,04	7,62-7,96
p (t-test)	0,0074		

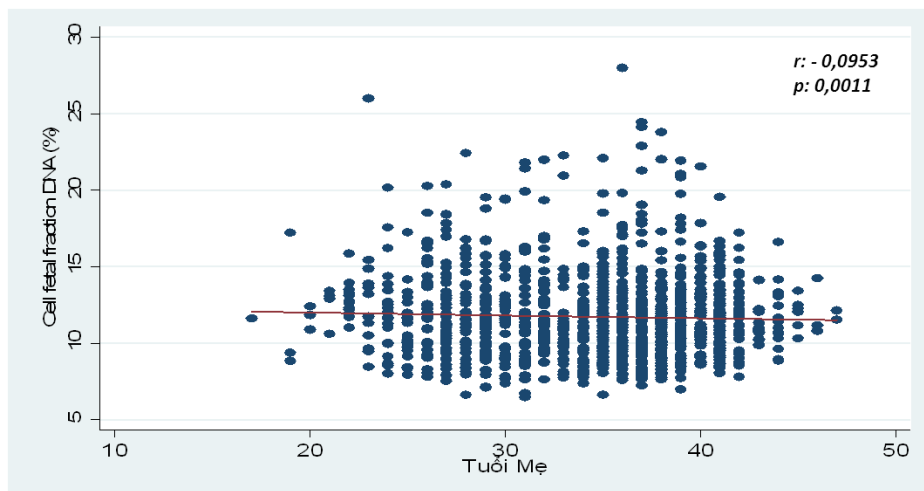
Nồng độ cffDNA ở thai phụ có cân nặng dưới 60kg là $7,89 \pm 3,07\%$, cao hơn thai phụ có cân nặng trên 60kg là $7,30 \pm 2,89\%$. Tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và cân nặng thai phụ < 60kg và > 60kg, $p = 0,0074$.



Biểu đồ 3.8 - 3.9. Nồng độ cffDNA và cân nặng, BMI

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

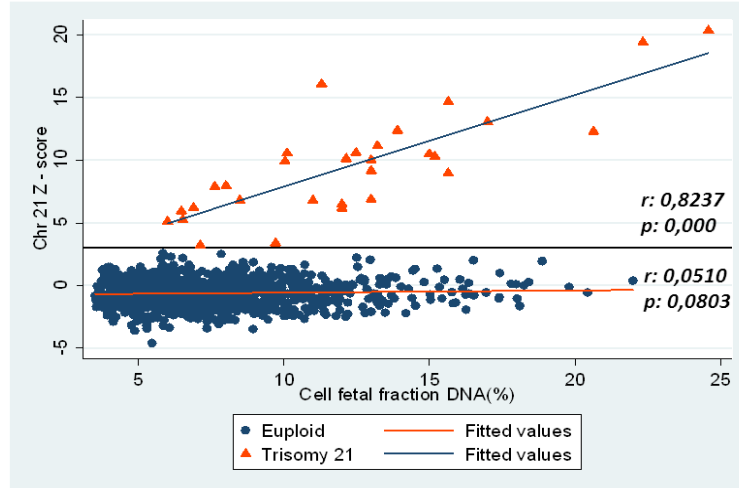
3.3.2.4. Mối tương quan giữa nồng độ cffDNA và tuổi thai phụ



Biểu đồ 3.10. Nồng độ cffDNA và tuổi thai phụ

Nồng độ cffDNA tỷ lệ nghịch với tuổi thai phụ, nồng độ cffDNA giảm khi tuổi thai phụ tăng, mối tương quan là có ý nghĩa thống kê, $p = 0,0011$, tuy nhiên mối tương quan rất yếu.

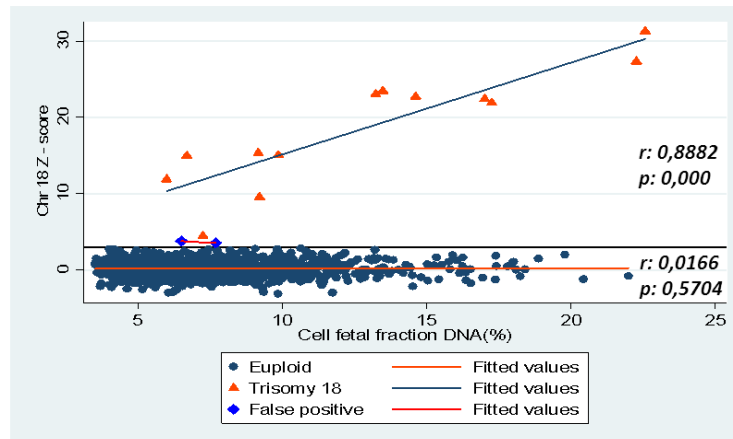
3.3.2.5. *Nồng độ cffDNA và điểm z-score của NST 21, 18, 13, X*
 - **Nồng độ cffDNA và điểm z-score NST 21**



Biểu đồ 3.11. *Nồng độ cffDNA và z-score NST 21*

Phát hiện mối tương quan thuận có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trong nhóm NIPS dương tính với trisomy 21, $p = 0,0000$. Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trường hợp NIPS âm tính với trisomy 21, $p = 0,0803$.

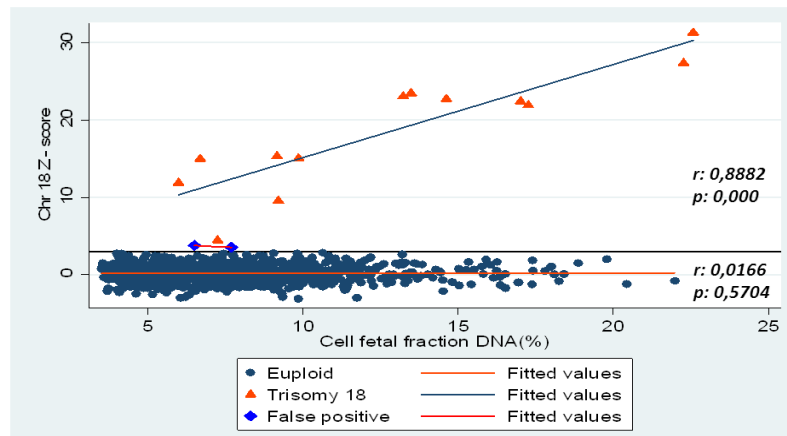
- **Nồng độ cffDNA và điểm z-score NST 18**



Biểu đồ 3.12. *Nồng độ cffDNA và z-score NST 18*

Nghiên cứu phát hiện mối tương quan thuận có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trong nhóm NIPS dương tính với trisomy 18, $p = 0,000$. Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trường hợp NIPS âm tính với trisomy 18, $p = 0,5704$.

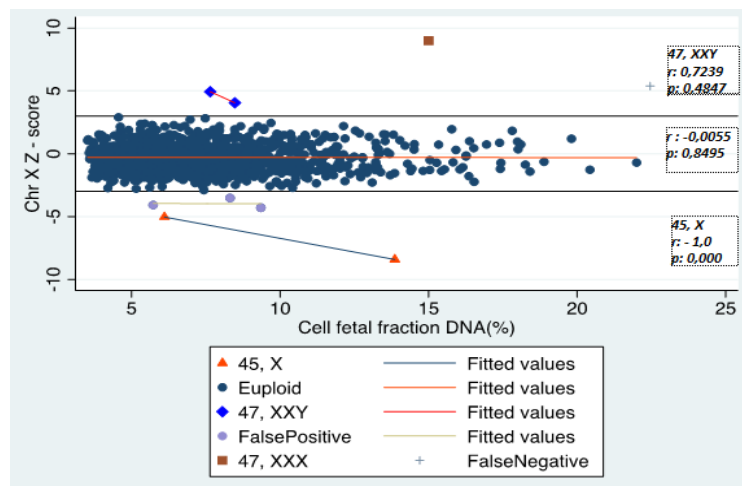
- Nồng độ cffDNA và điểm z-score NST 13



Biểu đồ 3.13. Nồng độ cffDNA và z-score NST 13

Nghiên cứu phát hiện mối tương quan thuận có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trong nhóm NIPS dương tính với trisomy 13, $p = 0,000$. Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trường hợp NIPS âm tính với trisomy 13, $p = 0,7197$.

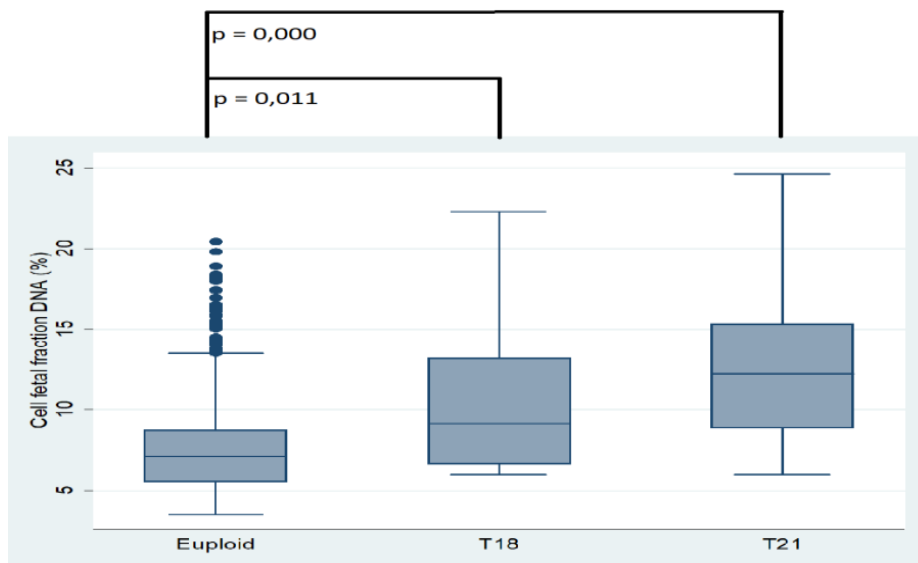
- Nồng độ cffDNA và điểm z-score NST X



Biểu đồ 3.14. Nồng độ cffDNA và z-score NST X

Phát hiện mối tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trong nhóm NIPS dương tính với 45,X; $p = 0,000$. Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trường hợp NIPS dương tính với 47,XXY; $p = 0,4847$. Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và z-score trường hợp NIPS âm tính với NST giới tính X, $p = 0,8495$.

3.3.2.6. Nồng độ cffDNA và trisomy 21, trisomy 18 (từ 10 - 20 tuần 6 ngày)



Biểu đồ 3.15. Nồng độ cffDNA và trisomy 18, 21
(Kiểm định ANOVA 1 chiều hiệu chỉnh Bonferoni)

Kết quả cho thấy có 20 thai phụ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính thật với trisomy 21 và 07 thai phụ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính thật với trisomy 18 trên thai phụ có tuổi thai từ 10 - 20 tuần 6 ngày, trong đó nồng độ cffDNA ở nhóm có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính thật với trisomy 21 và trisomy 18 lần lượt là 12,55% và 10,55%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm kết quả xét nghiệm NIPS âm tính có nồng độ cffDNA là 7,5% ($p = 0,000$ và $p = 0,011$). Không tìm thấy sự khác biệt về nồng độ cffDNA giữa 2 nhóm NIPS dương tính với trisomy 21 và trisomy 18, $p = 0,298$.

3.3.3. Kết quả xét nghiệm karyotype từ dịch ối trên mẫu có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính

59 mẫu có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính được chỉ định thủ thuật xâm lấn hút dịch ối khi thai phụ được trên 16 tuần thai, làm xét nghiệm karyotype.

Bảng 3.16. Kết quả xét nghiệm karyotype từ dịch ối

Karyotype				NIPS dương tính	
Kiểu NST	n	%	Kết luận	Kết quả	n
Bất thường	51	86,4			
47,XY,+21	21	35,5	Thai nam HC Down, trisomy 21	T21	21
47,XX,+21	08	13,5	Thai nữ HC Down, trisomy 21	T21	08
Mos 47,XX,+21[8]/ 46,XX [72]	01	1,7	Thai nữ HC Down, khả năng dòng trisomy 21 và dòng tế bào 46,XX	T21	01
47,XX,+18	09	15,3	Thai nữ HC Edwards, trisomy 18	T18	09
46,XX,der(21) t(18;21)(q11; p11)	01	1,7	Thai nữ HC Edwards, chuyển đoạn không cân bằng giữa NST 18 và 21 tạo ra trisomy nhánh dài NST 18	T18	01
47,XY,+18	03	5,1	Thai nam HC Edwards, trisomy 18	T18	03
47,XX,+13	01	1,7	Thai nữ HC Patau, trisomy 13	T13	01
47,XY,+13	01	1,7	Thai nam HC Patau, trisomy 13	T13	01
45,X	01	1,7	Thai HC Turner, monosomy X	MX	01
46,X,i(Xq)	01	1,7	Thai nữ HC Turner, có 1 NST đột biến cấu trúc dạng isoXq	MX	01
47,XXY	02	3,4	Thai nam HC Klinefelter	47,XXY	02
47,XYY	01	1,7	Thai nam HC Jacob	47,XXY	01
47,XXX	01	1,7	Thai trisomy X	47,XXX	01
Bình thường	08	13,6			
46,XY	04	6,8	Thai nam, bình thường	T13	03
				47,XYY	01
46,XX	04	6,8	Thai nữ, bình thường	T18	02
				MX	02
Tổng	59	100,0			59

Ghi chú: T: trisomy; MX: Monosomy X

Sử dụng phương pháp di truyền tế bào, nuôi cấy tế bào ôi từ 10 - 15 ngày, sau đó thu hoạch, nhuộm băng G và phân tích NST lập karyotype. Kết quả xét nghiệm karyotype cho thấy 8 mẫu ôi có kết quả bộ NST có số lượng và cấu trúc bình thường, chiếm 13,6%; 51 mẫu ôi có kết quả bất thường NST chiếm 86,4%, trong đó:

- 29 mẫu có hội chứng Down thuần [(47,XX,+21); (47,XY,+21)] chiếm 49%, 01 mẫu có hội chứng Down khảm (Mos 47,XX,+21[8]/46,XX[72]) chiếm 1,7%.

- 12 mẫu có hội chứng Edwards thuần [(47,XX,+18); (47,XY,+18)] chiếm 20,4%, 01 mẫu có chuyển đoạn không cân bằng giữa NST 18 và 21 tạo ra trisomy nhánh dài NST 18, 46,XX,der(21)t(18;21)(p11; q11) chiếm 1,7%.

- 02 mẫu có hội chứng Patau [(47,XX,+13); (47,XY,+13)] chiếm 3,4%.

- 02 mẫu có hội chứng Turner (45,X) chiếm 3,4%, trong đó có 01 mẫu 45,X; 01 mẫu có đột biến cấu trúc gây thiếu hụt các gen cần thiết trên nhánh dài NST X [46,X,i(Xq)].

- 02 mẫu có hội chứng Klinefelter (47,XXY) chiếm 3,4%.

- 01 mẫu có hội chứng Jacob (47,XYY) chiếm 1,7%.

- 01 mẫu có hội chứng trisomy X (47,XXX) chiếm 1,7%.

Các hình 3.4 - 3.6 trình bày một số hình ảnh xét nghiệm karyotype của một số trường hợp đặc biệt (hội chứng Down khảm, hội chứng Edwards do chuyển đoạn và hội chứng Turner do đột biến cấu trúc).

KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ

Họ và tên : Lê Thị Thu T

Năm sinh: 1981

Mã XN: 001604

Địa chỉ: Cầu giấy - HN

Giới tính: nữ

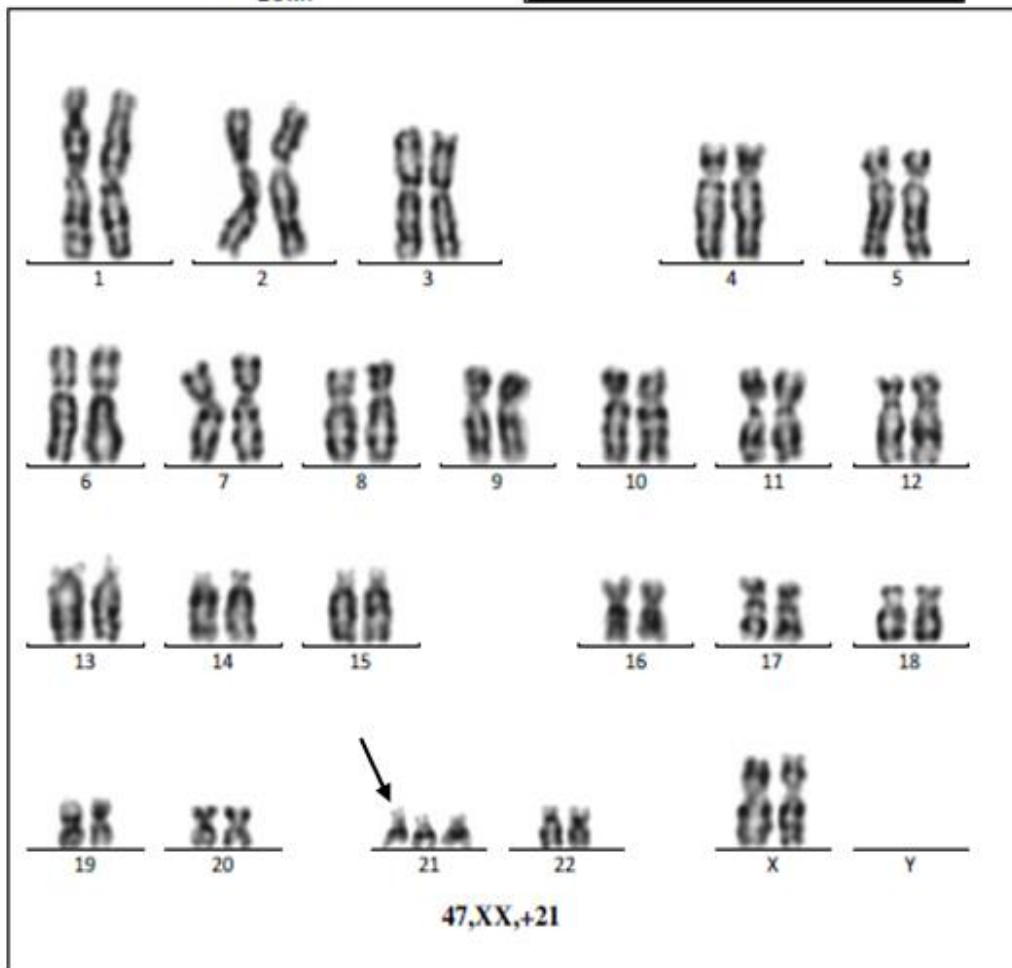
Bệnh phẩm: dịch ối

Ngày XN: 6/4/2018

Mã BN:

Người làm kĩ thuật: Phạm Thị Ngọc

Chẩn đoán lâm sàng: Thai nguy cơ cao HC
Down



Kết quả: mos 47,XX,+21 [8]/46,XX [72]

Hình 3.4. Kết quả phân tích NST từ dịch ối thai phụ L.T.T.T.

Khả 10% dòng T21 và 90% dòng tế bào 46,XX

[mos 47,XX,+21[8]/46,XX[72]]

KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM NHIÊM SẮC THỂ

Họ và tên : Nguyễn Thị Ngọc L

Năm sinh: 1987

Mã XN: 001654

Địa chỉ: Ba Đình - HN

Giới tính: nữ

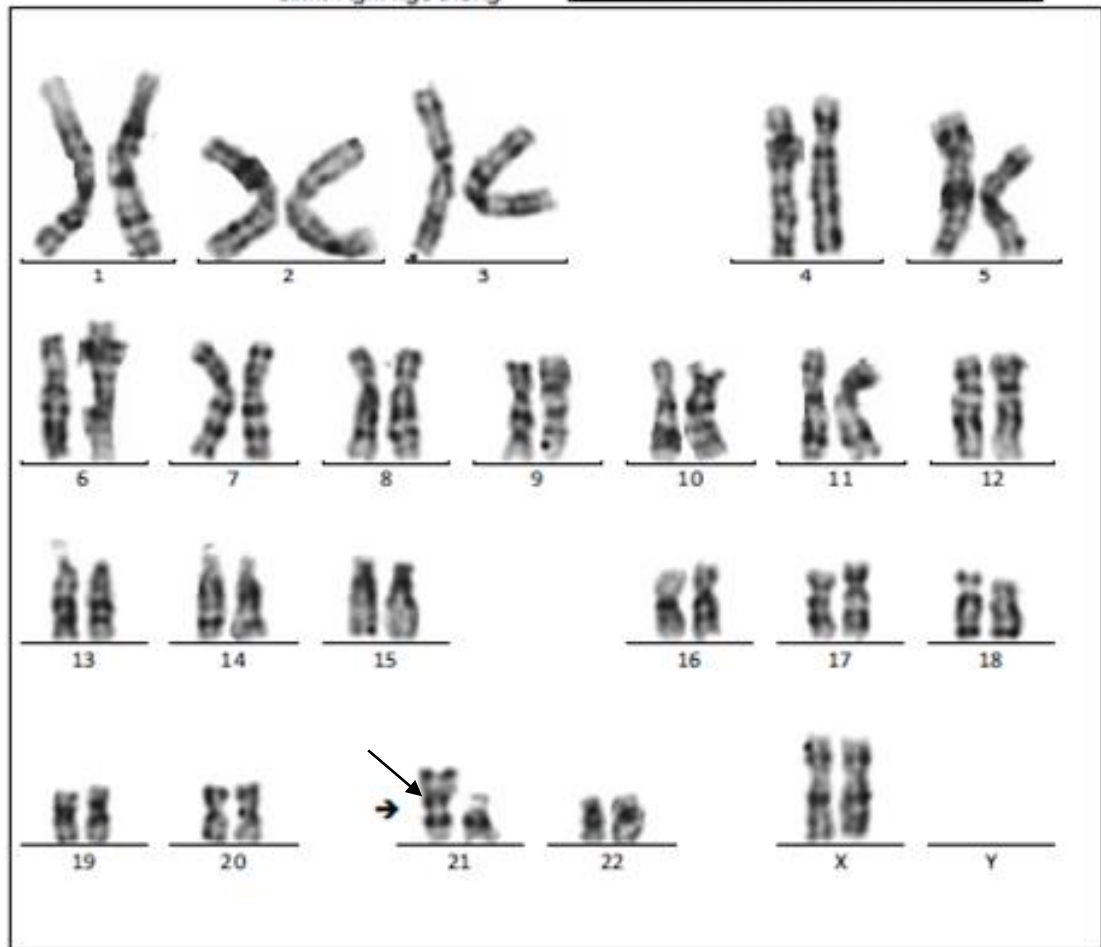
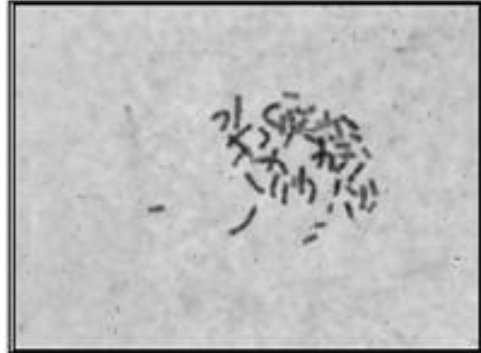
Bệnh phẩm: dịch ối

Ngày XN: 11/5/2018

Mã BN:

Người làm kĩ thuật: Phạm Thị Ngọc

Chẩn đoán lâm sàng: TD teo thực quản bẩm sinh. Nghi ngờ thông



Kết quả: 46,XX,der(21)t(18;21)(q11;p11)

Hình 3.5. Kết quả phân tích NST từ dịch ối thai phụ N.T.N.L.
 Chuyển đoạn không cân bằng giữa NST 18 và 21 tạo ra trisomy nhánh dài NST 18 [46,XX,der(21)t(18;21)(p11;q11)]

KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ

Họ và tên : Nguyễn Thu Th

Năm sinh: 1987

Mã XN: AH18162

Địa chỉ:

Giới tính:

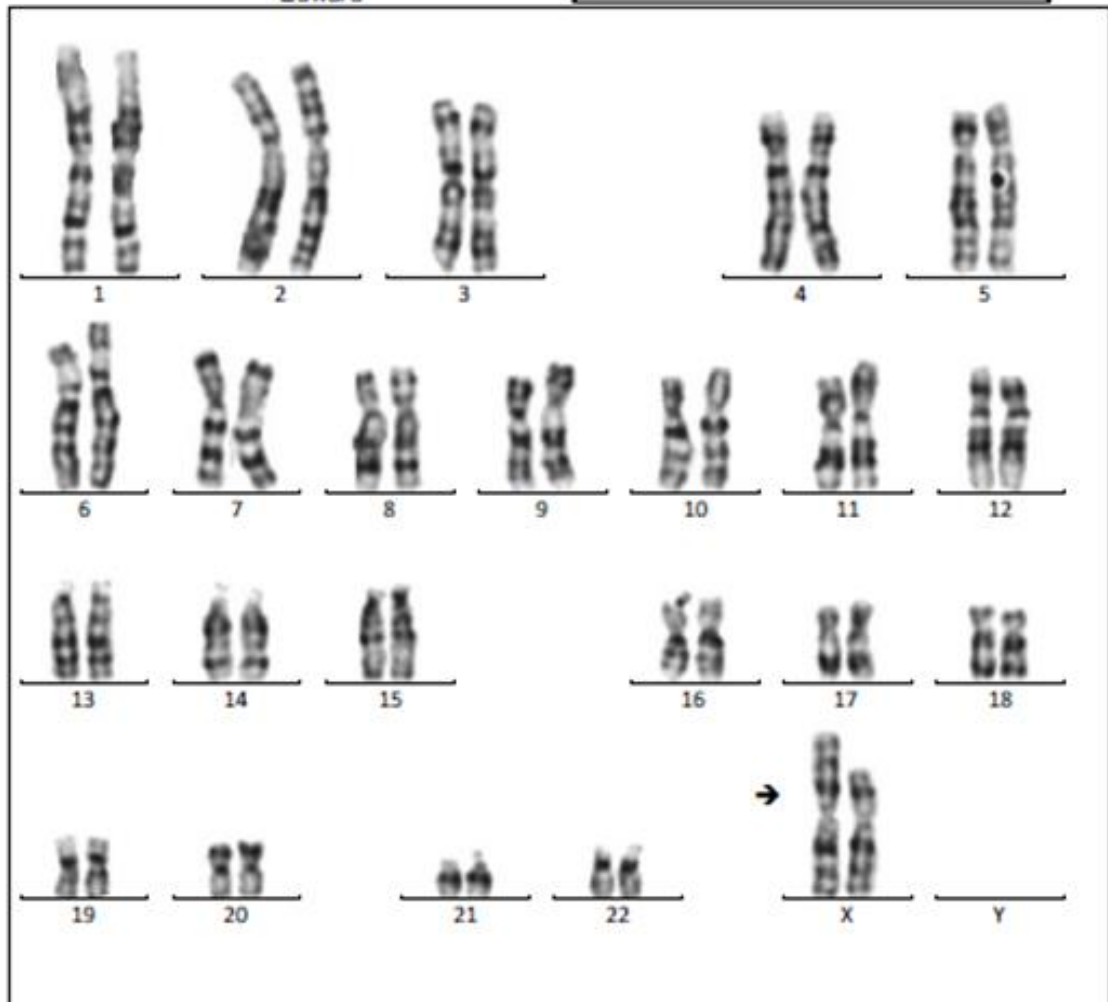
Bệnh phẩm: dịch ối

Ngày XN: 24/11/2018

Mã BN:

Người làm kĩ thuật:

Chẩn đoán lâm sàng: SLNC cao hội chứng Edward



Kết quả: 46,X,i(X)(q10)

Hình 3.6. Kết quả phân tích NST từ dịch ối thai phụ N.T.T.

1 NST X đột biến cấu trúc dạng isoXq [46,X,i(Xq)]

3.3.4. Các trường hợp kết quả xét nghiệm NIPS không phù hợp với kết quả xét nghiệm karyotype

Bảng 3.17. Các trường hợp kết quả xét nghiệm NIPS không phù hợp với kết quả xét nghiệm karyotype

Stt	Tuổi	SLTSTT	FF (%)	Z	NIPS	Sex	Karyotype
1	31	CFTS (T21: 1/227)	7,69	3,53	T18	F	46,XX
2	37	Tuổi thai phụ	6,52	3,76	T18	F	46,XX
3	41	Tuổi thai phụ	8,95	3,50	T13	M	46,XY
4	38	Tiền sử (con đầu bất thường)	6,56	3,67	T13	M	46,XY
5	26	TT (T21: 1/201)	5,00	3,22	T13	M	46,XY
6	38	Tuổi thai phụ	8,31	- 3,52	45,X	F	46,XX
7	29	TT (T21: 1/194)	9,35	- 4,30	45,X	F	46,XX
8	30	TT (T21: 1/73)	5,73	- 4,08	47,XYY	M	46,XY
9	37	Không quan sát được XSM	22,00	5,38	47,XXY	M	47,XXY
10	27	TT (T18:1/110)	5,00		NCT	F	69,XXX

Ghi chú: SLTSTT: sàng lọc trước sinh truyền thống; TT: triple test; CFTS: test kết hợp thai kỳ 1; M: Nam; F: Nữ; T21: trisomy 21; NCT: nguy cơ thấp; XSM: xương sống mõi; Z: z-score; cffDNA: FF; Giới tính: sex

Kết quả xét nghiệm karyotype từ tế bào ối phát hiện 10 mẫu kết quả xét nghiệm NIPS không phù hợp với kết quả karyotype.

+ Trong đó có 08 mẫu xét nghiệm NIPS dương tính giả đều có nguy cơ cao với từ 1 loại lệch bội NST 21, 18, 13 khi sàng lọc bằng các phương pháp sàng lọc truyền thống:

- 05 mẫu xét nghiệm NIPS dương tính giả với trisomy 18, trisomy 13 đều có điểm z-score của từng NST đặc hiệu trong khoảng $3 < z\text{-score} < 5$. Kết quả xét nghiệm karyotype có bộ NST bình thường về số lượng và cấu trúc.

- 03 mẫu kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả với 45,X và 47,XYY có điểm z-score NST X trong khoảng $-3 < z\text{-score} < -5$. Kết quả xét nghiệm karyotype có bộ NST bình thường về số lượng và cấu trúc.

- 01 mẫu kết quả xét nghiệm NIPS âm tính giả với 47,XYY mặc dù có điểm z-score NST X là 5,38 nhưng kết quả giải trình tự có tín hiệu NST Y cao là 0,001043 (tín hiệu NST Y với giới tính nam có ngưỡng $\geq 0,0003$). Kết quả xét nghiệm NIPS là 47,XXY, kết quả xét nghiệm karyotype lại là 47,XYY.

+ 01 mẫu kết quả xét nghiệm NIPS âm tính, do trong quá trình mang thai sau xét nghiệm NIPS phát hiện bất thường hình thái trên siêu âm, được chỉ định thủ thuật xâm lấn hút dịch ối, phân tích bộ NST có kết quả là 69,XXX (thể tam bội).

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

Bảng 3.18. Xét nghiệm NIPS dương tính với trisomy 21, 18, 13

NIPS (+)	Tỷ lệ % (95% CI)				Tỷ lệ mắc %
	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

Ghi chú: Trisomy: T; Se: độ nhạy; Sp: độ đặc hiệu; PPV: Giá trị tiên đoán dương; NPV: giá trị tiên đoán âm. TP: dương tính thật; FP: dương tính giả; FN: Âm tính giả.

50 mẫu có kết quả NIPS dương tính với trisomy 21, 18 và 13, kết quả xét nghiệm karyotype từ dịch ối 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 100,0% (95% CI: 88,0 - 100,0%), trisomy 18 là 100,0% (95% CI: 75,0 - 100,0%), trisomy 13 là 100,0% (95% CI: 16,0 - 100,0%). Độ nhạy chung cho cả 3 loại trisomy là 100,0% (95% CI: 92,1 - 100,0%). Độ đặc hiệu cho trisomy 21 là 100,0% (95% CI: 100,0 - 100,0%), trisomy 18 và 13 đều là 99,8% (95% CI: 99,0 - 100,0%). Độ đặc hiệu chung cho cả 3 loại trisomy là 99,6% (95% CI: 99,0 - 99,9%). Giá trị tiên đoán dương tính cao nhất là trisomy 21 chiếm 100,0% (95% CI: 88,0 - 100,0%), tiếp theo là trisomy 18 chiếm 87% (95% CI: 60,0 - 98,0%), thấp nhất là trisomy 13 chiếm 40% (95% CI: 5,0 - 85,0%). 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 100,0% (95% CI: 99,7 - 100,0%). 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 3.19. Xét nghiệm 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.

09 mẫu có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với lệch bội NST giới tính, kết quả xét nghiệm karyotype phát hiện 5 mẫu xét nghiệm 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 xét nghiệm karyotype bình thường) và 1 mẫu âm tính giả (1 mẫu dương tính với 47,XXY, kết quả xét nghiệm karyotype là 47,XYY). Độ nhạy cho monosomy 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 lệch bội NST giới tính là 83,3% (95% CI: 35,9 - 99,6). Độ đặc hiệu cho monosomy 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 lệch bội NST giới tính 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 monosomy X chiếm 50% (95% CI: 6,76 - 93,2%), 47,XXY chiếm 66,7% (95% CI: 9,43 - 99,2%), cao nhất là trisomy X chiếm 100% (95% CI: 2,5 - 100%). Giá trị tiên đoán dương cho lệch bội NST giới tính 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 lệch bội NST giới tính là 99,9 % (95% CI: 99,5 - 100,0%).

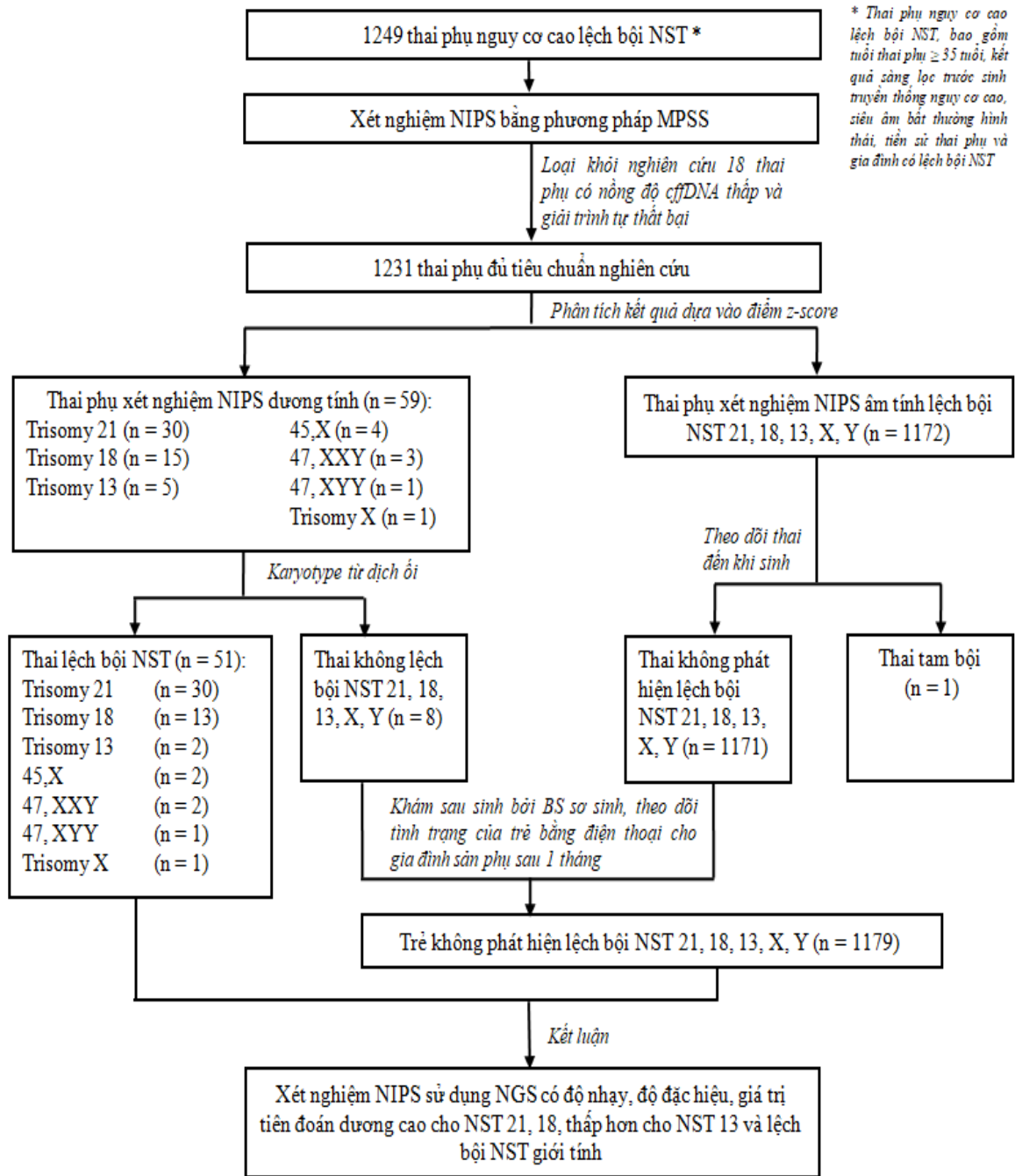
Bảng 3.20. Giá trị xét nghiệm NIPS

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 lệch bội NST giới tính 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%.

3.3.6. Kết quả nghiên cứu



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

1231 thai phụ tham gia nghiên cứu, sau giải trình tự phát hiện 59 mẫu có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính được chỉ định thủ thuật xâm lấn hút dịch ối làm xét nghiệm karyotype phân tích bộ NST, trong đó 50 trường hợp

có kết quả dương tính thật, 08 trường hợp dương tính giả (08 thai phụ có kết quả karyotype bình thường) và 01 trường hợp âm tính giả với 47,XYY (mẫu dương tính với 47,XXY, kết quả xét nghiệm karyotype là 47,XYY).

- 51 thai phụ lệch bội NST có 49 thai phụ đã đình chỉ thai, 02 thai phụ được chẩn đoán 47,XYY và trisomy X đã sinh con khỏe mạnh.

- 01 thai phụ mang thai tam bội (triploidy) đã đình chỉ thai từ 22 tuần.

- 08 thai phụ có kết quả karyotype bình thường đều sinh con khỏe mạnh.

- 1171 thai phụ có kết quả sàng lọc NIPS âm tính đã sinh con khỏe mạnh.

Như vậy có thể thấy xét nghiệm NIPS có độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương tính cao phát hiện lệch bội NST 21, 18, thấp hơn với trisomy 13 và lệch bội NST giới tính.

3.3.7. Đánh giá kết quả xét nghiệm NIPS dựa trên yếu tố nguy cơ

3.3.7.1. Giá trị tiên đoán dương của xét nghiệm NIPS dựa vào yếu tố nguy cơ

Bảng 3.21. Giá trị tiên đoán dương dựa vào yếu tố nguy cơ

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

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; TP: dương tính thật; FP: dương tính giả; FN: Âm tính giả; PPV: Giá trị tiên đoán dương

Kết quả xét nghiệm NIPS dương tính do siêu âm hình thái bất thường phát hiện 23 mẫu chiếm tỷ lệ cao nhất là 18,7%, karyotype phát hiện 22 mẫu dương tính thật với lệch bội NST, giá trị tiên đoán dương tính chiếm tỷ lệ cao nhất là 95,7%. Tiếp theo là kết quả xét nghiệm NIPS dương tính do có trên 1 yếu tố nguy cơ phát hiện 23 mẫu chiếm tỷ lệ 4,9%, giá trị tiên đoán dương tính chiếm tỷ lệ 91,3%. Kết quả xét nghiệm NIPS dương tính do tuổi thai phụ phát hiện 25 mẫu chiếm tỷ lệ thấp là 3,6%, giá trị tiên đoán dương tính do tuổi thai phụ chiếm tỷ lệ 80,0%. Kết quả xét nghiệm NIPS dương tính do sàng lọc huyết thanh thai phụ phát hiện 16 mẫu chiếm tỷ lệ thấp nhất 2,0%, giá trị tiên đoán dương tính do sàng lọc huyết thanh thai phụ chiếm tỷ lệ thấp nhất là 75,0%.

3.3.7.2. Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến tuổi thai phụ

Bảng 3.22. Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến tuổi thai phụ

Tuổi thai phụ	NIPS (n, %)		Tổng (n, %)	p (χ^2 test)
	Dương tính	Âm tính		
≥ 35 tuổi	25 (3,6%)	669 (96,4%)	694 (100,0%)	0,026
< 35 tuổi	34 (6,3%)	503 (93,7%)	537 (100,0%)	
Tổng	59 (4,79%)	1172 (95,21%)	1231 (100,0%)	

Tỷ lệ thai phụ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính tuổi ≥ 35 là 3,6% (25/694). Tỷ lệ thai phụ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính tuổi dưới 35 là 6,3% (34/537). Không phát hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm tuổi thai phụ, $p = 0,026$.

3.3.7.3. Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến kết quả sàng lọc huyết thanh thai phụ nguy cơ cao trisomy 21

Bảng 3.23. Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến sàng lọc huyết thanh thai phụ nguy cơ cao trisomy 21

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

Trong số 814 mẫu sàng lọc huyết thanh thai phụ có 799 mẫu có nguy cơ cao trisomy 21, sau giải trình tự phát hiện 14 mẫu xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 1,75%, trong đó mẫu nguy cơ $\geq 1/10$ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ cao nhất là 27,3% (3/11). Tiếp theo là mẫu có nguy cơ cao từ 1/11 - 1/50 có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 3,3% (4/120). Mẫu có nguy cơ $< 1/50$ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ thấp. Sự khác biệt về tỷ lệ xét nghiệm NIPS dương tính giữa các nhóm sàng lọc huyết thanh mẹ nguy cơ cao là có ý nghĩa thống kê, $p = 0,000$.

3.3.7.4. Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến siêu âm bất thường

Bảng 3.24. Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến siêu âm bất thường

Siêu âm bất thường	NIPS (n, %)		Tổng (n, %)
	Dương tính	Âm tính	
NT ≥ 2 mm	05 (4,9%)	97 (95,1%)	102 (100,0%)
Hình thái bất thường	14 (82,4%)	03 (17,6%)	17 (100,0%)
Kết hợp*	04 (100,0%)	0 (0,0%)	04 (100,0%)
Tổng	23 (18,7%)	100 (81,3%)	123 (100,0%)

Ghi chú: NT: độ mờ da gáy; * Hình thái bất thường kết hợp với độ dày da gáy $\geq 3,5$ mm

Tổng số 123 mẫu có kết quả siêu âm hình thái bất thường phát hiện 23 mẫu xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 18,7%, trong đó kết quả xét nghiệm NIPS dương tính trên nhóm thai phụ có NT $\geq 3,5$ mm kết hợp với siêu âm hình thái bất thường có chiếm tỷ lệ cao nhất là 100,0% (4/4). Thai phụ siêu âm hình thái bất thường có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ cao là 82,4% (14/17). Thai phụ có NT ≥ 2 mm có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ thấp nhất là 4,9% (5/102).

Bảng 3.25. Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến độ mờ da gáy

Độ mờ da gáy (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%)	

Tổng số 830 mẫu có kết quả độ mờ da gáy (NT) phát hiện 31 mẫu xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 3,7%, trong đó thai phụ có NT ≥ 4 mm có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ cao nhất là 57,1% (4/7). Tiếp theo là thai phụ có NT từ 3,0 - 3,9mm có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 25,0% (5/20). Thai phụ có NT < 3,0mm có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ thấp nhất. Sự khác biệt về tỷ lệ xét nghiệm NIPS dương tính với các nhóm liên quan đến kích thước độ mờ da gáy là có ý nghĩa thống kê, p = 0,000.

3.3.7.5. Kết quả xét nghiệm NIPS dương tính liên quan đến các yếu tố nguy cơ

Bảng 3.26. Kết quả xét nghiệm NIPS liên quan đến các yếu tố nguy cơ

Yếu tố nguy cơ	NIPS (n, %)		Tổng (n, %)	p (χ^2 test)
	Dương tính	Âm tính		
1 YTNC	36 (4,7%)	728 (95,3%)	764 (100,0%)	0,865
≥ 1 YTNC	23 (4,9%)	444 (95,1%)	467 (100,0%)	
Tổng	59 (4,79%)	1172 (95,21%)	1231 (100,0%)	

Ghi chú: YTNC: Yếu tố nguy cơ

Tổng số 1231 mẫu nghiên cứu phát hiện 59 mẫu có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính, phát hiện 36 mẫu liên quan đến 1 yếu tố nguy cơ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 4,7%. 23 mẫu liên quan đến trên 1 yếu tố nguy cơ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ 4,9%. Sự khác biệt về tỷ lệ xét nghiệm NIPS dương tính giữa 2 nhóm là không có ý nghĩa thống kê, $p = 0,865$.

Chương 4

BÀN LUẬN

Sàng lọc trước sinh không xâm lấn (NIPS) phân tích DNA thai tự do từ huyết tương thai phụ bằng phương pháp giải trình tự song song khối lượng lớn ngẫu nhiên (MPSS) là một bước tiến mới của sàng lọc trước sinh. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng xét nghiệm NIPS không chỉ góp phần sàng lọc các lệch bội NST thường gặp (trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13) [91], mà còn được sử dụng để phát hiện các lệch bội NST giới tính thai nhi (lệch bội NST giới tính) [92]. Đồng thời, xét nghiệm NIPS đã làm giảm các thủ thuật xâm lấn (hút dịch ối và lấy mẫu gai rau), giúp giảm tỷ lệ mất thai từ thủ thuật xâm lấn. Tuy nhiên, xét nghiệm NIPS vẫn có tỷ lệ thất bại, kết quả dương tính giả, kết quả âm tính giả và một số kết quả dương tính có liên quan đến vấn đề sức khỏe của thai phụ. Hiện tại, xét nghiệm NIPS đã được ứng dụng rộng rãi tại nhiều nước trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Chính vì vậy, nghiên cứu giá trị của phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới sử dụng DNA thai tự do phát hiện lệch bội NST là thực sự cần thiết, nhằm cung cấp cho thầy thuốc chuyên khoa một số thông tin chính về xét nghiệm NIPS và những thách thức khi tư vấn xét nghiệm trong thực hành lâm sàng.

Nghiên cứu được thực hiện trên 1231 thai phụ nguy cơ cao mang thai trisomy 21, 18 và 13 do sàng lọc trước sinh truyền thống. Trong nghiên cứu, thai phụ có tuổi trên 35 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất, trong đó tuổi trung bình của các đối tượng nghiên cứu cũng phù hợp với tiêu chuẩn chọn mẫu trong nghiên cứu của McCullough [93]. Ở nhiều quốc gia, thai phụ có tuổi trên 35 tuổi thường được tư vấn thủ thuật xâm lấn, như hút dịch ối và lấy mẫu gai rau. Tuy nhiên, nhiều thai phụ có tuổi trên 35 tuổi không sẵn sàng chấp nhận thủ

thuật xâm lấn do có nguy cơ mất thai. Hiệp hội Thai phụ khoa Hoa Kỳ (ACOG) [94] đã cập nhật hướng dẫn và khuyến nghị tất cả thai phụ nên chấp nhận sàng lọc trước sinh bằng huyết thanh ở bất kỳ độ tuổi nào [95]. Như vậy, xét nghiệm NIPS có thể là một lựa chọn tốt nhất trong sàng lọc trước sinh đối với thai phụ có tuổi trên 35 tuổi và họ sẵn sàng chấp nhận xét nghiệm NIPS vì ưu điểm là xét nghiệm không xâm lấn và có độ chính xác cao.

Đánh giá việc thực hiện mục tiêu phát triển Thiên niên kỷ MDG5 (nâng cao sức khỏe bà mẹ cho tới năm 2015) cho thấy, Việt Nam có tỷ lệ thai phụ được khám thai trên 3 lần là 80,3%. Như vậy, có thể thấy rằng phụ nữ ngày nay đã quan tâm hơn đến việc chăm sóc sức khỏe khi mang thai. Mặc dù vậy vẫn còn sự chênh lệch đáng kể về tỷ lệ này ở các nhóm thai phụ do sự tác động từ nhiều yếu tố khác nhau, trong đó trình độ học vấn là yếu tố có tác động mạnh mẽ nhất. Tỷ lệ thai phụ có trình độ cao đẳng, đại học được khám thai tối thiểu 3 lần rất cao tới 96,3%, trong khi ở nhóm thai phụ không có bằng cấp chỉ là 22,3%. Sự chênh lệch này còn thể hiện rõ ở nhóm thai phụ sống ở thành thị và nông thôn, giữa nhóm dân tộc Kinh và dân tộc thiểu số, giữa nhóm thai phụ thuộc hộ nghèo và hộ giàu... Trong nghiên cứu, các thai phụ sống tại Hà Nội và có nghề nghiệp là cán bộ công chức có trình độ chiếm tỷ lệ cao là 72,0% và 72,3%. Tỷ lệ này cũng phù hợp với báo cáo đánh giá việc thực hiện mục tiêu MDG5 của chính phủ. Hơn nữa, xét nghiệm NIPS trong giai đoạn hiện nay vẫn còn có giá thành tương đối cao, do vậy sẽ phù hợp với một số đối tượng có trình độ và có thu nhập cao.

Tuổi thai trung bình trong nghiên cứu là 15 - 16 tuần, tuổi thai từ 14 - 20 tuần 6 ngày chiếm tỷ lệ cao, có thể do giá thành của xét nghiệm NIPS dựa trên kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới vẫn tương đối cao, tại thời điểm hiện tại xét nghiệm NIPS vẫn chưa được lựa chọn là phương pháp sàng lọc trước

sinh sơ cấp. Trong tương lai, với sự phát triển của các kỹ thuật giải trình tự, giá thành của xét nghiệm giải trình tự sẽ giảm xuống, xét nghiệm NIPS có thể được sử dụng như một phương pháp sàng lọc trước sinh sơ cấp, nhờ đó có thể thực hiện xét nghiệm NIPS với tuổi thai sớm hơn, trên tất cả nhóm dân số sản khoa [96].

Đối tượng thai phụ được lựa chọn vào nghiên cứu hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của McCullough và cộng sự [93], trong đó nhóm thai phụ được sàng lọc bằng huyết thanh thai phụ chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp theo là nhóm thai phụ có tuổi ≥ 35 tuổi, nhóm thai phụ có trên 1 yếu tố nguy cơ. Yếu tố nguy cơ do siêu âm hình thái bất thường và tiền sử thai phụ và gia đình có lệch bội NST chiếm tỷ lệ thấp nhất. Nhóm thai phụ có kết quả siêu âm hình thái bất thường chiếm tỷ lệ thấp có thể do phần lớn thai phụ được tư vấn thực hiện thủ thuật xâm lấn.

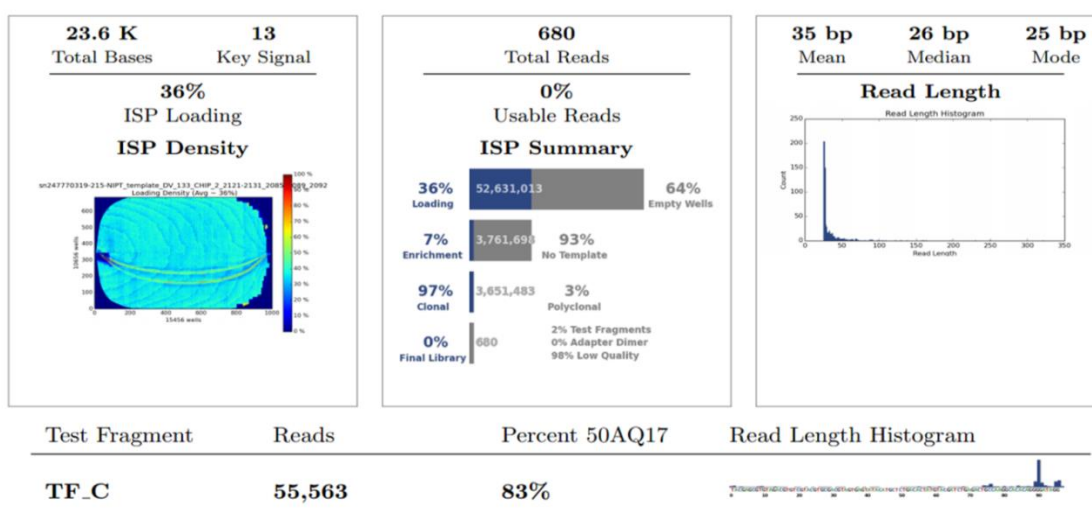
Cho đến nay, tất cả các hiệp hội liên quan đến sản phụ khoa trên thế giới như: Hội Thai phụ khoa Hoa Kỳ (ACOG), Hội Y học Mẹ và Thai (SMFM), Hội Siêu âm Thai phụ khoa Thế giới (ISUOG)... đều có sự thống nhất rằng phân tích nồng độ cfDNA từ huyết tương thai phụ bằng giải trình tự đồng thời khối lượng lớn toàn bộ bộ gen (MPSS) hoặc giải trình tự đích (CSS hoặc SNPs) là xét nghiệm tốt nhất sàng lọc lệch bội NST thai [65],[66]. Trong các phương pháp tiếp cận, hàng triệu đoạn DNA ngắn được giải trình tự đồng thời, khớp (alignment), lập bản đồ (map) và đối chiếu với bộ gen tham chiếu của người (hg19), sử dụng các thuật toán khác nhau xác định số lượng trình tự các đoạn DNA được tạo ra từ các NST khác nhau. Sau khi lập bản đồ, sử dụng phần mềm tin sinh học và các thuật toán đếm số lượng trình tự các đoạn DNA xác định số lượng NST, tăng hoặc giảm tương đối số lượng các NST cần đánh giá so với bộ NST tham chiếu (hg19) [8].

Hầu hết cffDNA 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 [31]. Vấn đề đáng lo ngại nhất trong thu nhận mẫu máu từ thai phụ là thoái hóa các tế bào bạch cầu, làm tăng các nồng độ DNA tự do dẫn đến giảm nồng độ cffDNA. Nghiên cứu sử dụng ống lấy mẫu chuyên dụng Streck BCTs có chứa chất kháng đông là K_3EDTA hiệu quả ức chế các nuclease trong vòng 14 ngày, giúp kéo dài thời gian xử lý huyết tương, có thể bảo quản và vận chuyển mẫu trong điều kiện nhiệt độ phòng từ 18°C đến 25°C. Hơn nữa, ống Streck BCTs chứa các thuốc thử bảo quản tế bào giúp ngăn chặn sự thoái hóa các tế bào bạch cầu [90],[97]. Để thu được nồng độ cffDNA cao, mẫu máu thai phụ phải đủ thể tích cần thiết là 10mL. Xử lý mẫu có vai trò rất quan trọng vì có thể gây ảnh hưởng đến kết quả giải trình tự, Mẫu máu được ly tâm 2 lần để tách các tế bào máu ra khỏi huyết tương và loại bỏ hết các mảnh vỡ tế bào còn sót lại trong huyết tương. Khi hút huyết tương, cần chú ý tránh hút vào lớp tế bào giữa huyết tương và hồng cầu bởi vì nồng độ DNA tự do có nguồn gốc từ thai phụ cao trong tế bào bạch cầu có thể pha loãng lượng DNA tự do trong huyết tương [98].

Các tế bào thai có thời gian bán hủy dài và duy trì trong tuần hoàn thai phụ nhiều năm sau [99]. Ngược lại, không phát hiện được cffDNA trong máu sản phụ 2 giờ sau sinh [40]. Vì vậy, cffDNA trở thành lựa chọn phù hợp và có độ nhạy cao hơn hẳn tế bào thai trong sàng lọc trước sinh không xâm lấn. Tuy nhiên, cffDNA có nồng độ rất thấp trong máu thai phụ (trung bình 10,0 - 20,0% tổng số DNA tự do) [32]. Do vậy, cần lựa chọn phương pháp tách DNA tự do phù hợp để có thể thu được nồng độ DNA tự do cao, nhờ đó tăng tỷ lệ thành công trong xét nghiệm giải trình tự gen thế hệ mới. Nghiên cứu sử dụng hệ thống tự động tách DNA tự do, DNA tự do sau đó được xác định nồng độ bằng máy quang phổ phân tích chuỗi DNA kép cho thấy nồng độ

DNA tự do trong khoảng 2,24 - 11,7ng/ μ L, cao hơn hẳn so với các phương pháp tách DNA bằng tay sử dụng các kit hóa chất hiện có trên thị trường là 5 - 50ng/mL [100]. Điều này cũng hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Houfflin-Debarge và cộng sự năm 2000 cho thấy sử dụng các phương pháp tách DNA tự động thu được nồng độ DNA tự do cao hơn 40,7% so với các phương pháp tách DNA bằng tay [101]. Xác định chất lượng DNA tự do (nồng độ và kích thước cffDNA) bằng kiểm tra chất lượng DNA thư viện, kết quả nghiên cứu cho thấy mặc dù nồng độ DNA thư viện có biên độ dao động lớn nhưng có tới 80,0% kích thước DNA thư viện phù hợp với chiều dài đoạn DNA tự do sau khi đã được gắn barcode và adaptor (266 - 271bp). Các mẫu có kích thước DNA không đạt tiêu chuẩn sau khi kiểm tra chất lượng sẽ được tạo DNA thư viện lại lần 2 (kích thước DNA > 400bp). Tùy thuộc vào nồng độ DNA thư viện được tạo ra mà có thể có nhiều hơn 1 loại DNA gắn lên bề mặt hạt ISP (Ion Sphere Particle) trong môi trường emulsion PCR (ePCR) gây nên hiện tượng polyclonal. Tỷ lệ polyclonal cao sẽ gây ra tín hiệu nhiễu trong kết quả giải trình tự. Do đó, nồng độ DNA thư viện cần được pha loãng tới nồng độ tối ưu để khả năng xảy ra hiện tượng polyclonal là thấp nhất. Trong nghiên cứu, quá trình tối ưu quy trình giải trình tự, DNA thư viện đã gắn mã vạch được pha loãng theo nồng độ là 70pM, 65pM, 60pM và 55pM. Nhận thấy với nồng độ 55pM, hiện tượng polyclonal là thấp nhất so với các nồng độ 70pM, 65pM và 60pM. Vì vậy nghiên cứu đã sử dụng mẫu DNA thư viện có gắn mã vạch pha loãng ở nồng độ 55pM để cho vào máy chuẩn bị thư viện giải trình tự. Trong điều kiện tối ưu, chỉ có 1 loại DNA thư viện được gắn lên bề mặt hạt ISP trong môi trường ePCR. DNA thư viện sau khi được gắn lên bề mặt hạt ISP sẽ được nhân bản và nạp vào chip giải trình tự. Chất lượng nạp mẫu vào chip giải trình tự được biểu thị bằng biểu đồ nhiệt. Biểu đồ nhiệt hiển thị màu sắc không đều, có nhiều màu vàng, xanh chứng tỏ mật độ hạt ISP được

nạp vào chip thấp (< 60%), dẫn tới lượng dữ liệu giải trình tự thu được thấp, quá trình giải trình tự thất bại (Hình 4.1). Biểu đồ nhiệt hiển thị màu sắc càng càng đỏ cho thấy mật độ hạt ISP được nạp vào giếng càng cao chứng tỏ quá trình giải trình tự thành công (hình 3.2). Ngoài ra, một số đoạn trình tự kém chất lượng như đoạn đọc DNA quá ngắn (low quality) hoặc không xác định được các tín hiệu của đoạn trình tự DNA chuẩn (key signal), sự hình thành adapter dimer (sự hình thành dimer giữa các adapter với nhau) cũng ảnh hưởng tới chất lượng hạt ISP. Nghiên cứu, thực hiện 102 lần giải trình tự với 115 chip, kết quả cho thấy mật độ hạt ISP trung bình nạp vào chip đạt 88,5% đạt yêu cầu chất lượng. Tổng số giếng trên bề mặt chip đạt 150 triệu giếng, do vậy có 133,75 triệu giếng chứa hạt ISP đạt yêu cầu chất lượng. Tỷ lệ các hạt polyclonal, trình tự kém chất lượng và adapter dimer trong các lần giải trình tự nằm trong ngưỡng cho phép. Với những lần giải trình tự thất bại thường do chất lượng đầu vào DNA thư viện thất bại (hóa chất tạo thư viện, thư viện được gắn barcode kém, pha loãng mẫu không đạt dẫn đến đầu vào thư viện quá thấp hoặc cao quá mức), chất lượng chip (loại chip sử dụng, hạn sử dụng, chip lỗi), hóa chất và máy chuẩn bị DNA thư viện để giải trình tự lỗi...



Hình 4.1. Giải trình tự thất bại

Kết quả nghiên cứu cho thấy lượng dữ liệu thô sau giải trình tự đạt được trung bình 13,3Gb trên 1 chip (tương đương 13,3 tỉ bases), 14 mẫu trên 1 chip. Do đó, mỗi thai phụ sẽ có lượng dữ liệu giải trình tự tương đương với 0,95 tỉ base. Bộ gen người khoảng 3,2 tỉ base, do đó dữ liệu giải trình tự đạt độ phủ trung bình là 0.3X tương đương với nghiên cứu của Jeon và cộng sự [100]. Khoảng $60,6 \pm 5,8\%$ hạt ISP đạt chất lượng (tương đương 78,9 triệu giếng hay đoạn đọc DNA). Do vậy trung bình sẽ có khoảng 5,6 triệu lần đọc DNA thô trên một mẫu. Kết quả nghiên cứu phù hợp với báo cáo của Lo và cộng sự cho thấy trung bình có 5,86 triệu lần đọc DNA thô trên một mẫu với chiều dài trung bình đoạn đọc DNA là 161bp [102],[103].

Nghiên cứu sử dụng thuật toán TMAP (Torrent Mapping Alignment Program) được tạo ra bởi Nils Homer và cộng sự từ công ty Life Technologies 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 [104]. Thuật toán TMAP được sử dụng để khớp hay lắp ráp (align) dữ liệu trình tự của mẫu với trình tự hg19/GRCh37. Toàn bộ trình tự đoạn đọc DNA duy nhất (URs) được lắp ráp và so sánh với trình tự hg19. Chỉ số hiệu suất được xác định bằng cách sử dụng thang điểm chất lượng khớp (Alignment quality - AQ) hay còn gọi là độ chính xác của trình tự các đoạn đọc DNA khi so sánh với trình tự hg19 biểu hiện bằng giá trị: AQ17 (2% xảy ra lỗi), AQ20 (1% xảy ra lỗi). Kết quả nghiên cứu cho thấy 99,6% các đoạn đọc sắp xếp được vào hg19 với chiều dài trung bình đoạn đọc DNA khoảng 160,5bp, tương đương với vùng khảo sát khi kiểm tra chất lượng DNA thư viện (sau khi loại bỏ barcode và adapter). Các đoạn đọc DNA có kích thước ngắn thông thường sẽ có điểm chính xác gần cao, điểm chính xác tiếp tục duy trì đối với các đoạn đọc 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.

Một vấn đề với xét nghiệm NIPS là không cung cấp được kết quả cho thai phụ. Về cơ bản có ba nguyên nhân: thứ nhất, các vấn đề từ quá trình lấy mẫu và vận chuyển mẫu (thể tích máu không đủ, tan máu, nhầm lẫn khi dán barcode và vận chuyển mẫu đến phòng xét nghiệm); thứ hai, nồng độ cffDNA thấp, thường dưới 4%; và thứ ba, xét nghiệm giải trình tự thất bại (bao gồm tách DNA tự do, quá trình khuếch đại hoặc giải trình tự DNA tự do không thành công) [68].

Khi kết quả xét nghiệm NIPS không được báo cáo hay không diễn giải được, khuyến cáo làm xét nghiệm lặp lại lần 2. Nếu xét nghiệm lần 2 thất bại, tư vấn sàng lọc bằng phương pháp khác hoặc chỉ định thủ thuật xâm lấn như hút dịch ối hoặc lấy mẫu gai rau [43].

Trong nghiên cứu, tỷ lệ thất bại chung của xét nghiệm NIPS là 1,44%, trong đó 1,36% do cffDNA thấp và 0,08% do nguyên nhân do giải trình tự thất bại (dữ liệu giải trình tự nhiễu cao). Tỷ lệ thất bại khi lặp lại xét nghiệm lần 2 là 37,5%. Kết quả nghiên cứu phù hợp với nghiên cứu của McCullough et al và cộng sự báo cáo tỷ lệ thất bại chung xét nghiệm NIPS là 1,3% và tỷ lệ thành công với xét nghiệm lặp lại chiếm 2/3 trường hợp khi sử dụng phương pháp MPSS [93], báo cáo của Taneja và cộng sự cho thấy phương pháp MPSS tỷ lệ xét nghiệm giải trình tự thất bại là 0,1% [105]. Phân tích tổng hợp của Gil và cộng sự từ 35 nghiên cứu báo cáo tỷ lệ thất bại từ quá trình lấy mẫu và vận chuyển mẫu dao động từ 0,03 - 11,1% và tỷ lệ không cung cấp kết quả từ các mẫu được phân tích dao động từ 0 - 12,2%. 11 trong số 35 nghiên cứu báo cáo lý do thất bại do nồng độ cffDNA thấp dao động từ 0,1% đến 6,1%. Ngoài ra, 3 nghiên cứu báo cáo tỷ lệ không có kết quả các trường hợp trisomy là 5,9% và lệch bội NST giới tính là 11,3% [68]. Nghiên cứu đánh giá tỷ lệ thất bại từ các phương pháp giải trình tự, với phương pháp MPSS có tỷ lệ thất bại thấp nhất là

1,58%, tiếp theo là phương pháp CSS có tỷ lệ thất bại là 3,56%, và phương pháp có tỷ lệ thất bại cao nhất là SNPs có tỷ lệ thất bại 6,39% [106]. Phương pháp giải trình tự có tỷ lệ thất bại cao có thể làm tăng tỷ lệ dương tính giả, giảm giá trị tiên đoán dương và tăng khả năng mất thai từ thủ thuật xâm lấn. Do vậy, các phòng xét nghiệm NIPS nên chọn phương pháp giải trình tự có tỷ lệ thất bại thấp nhất [106].

Nguyên nhân thất bại của xét nghiệm NIPS chiếm đến 50,0% là 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 (có thể liên quan đến thời điểm lấy mẫu trước 10 tuần thai) hoặc kết hợp hai yếu tố [43],[107],[108]. Nồng độ cffDNA thấp còn có thể do thai mắc trisomy 18, trisomy 13, monosomy X và thể tam bội (triploidy) [46]. 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 40,0 - 50,0% và tỷ lệ lệch bội cao hơn đáng kể trên những thai phụ không có kết quả xét nghiệm NIPS [46],[109]. Lấy mẫu phân tích lại chỉ có thể trả kết quả xét nghiệm được khoảng 50% trường hợp nhưng sẽ dẫn đến việc kéo dài thời gian chờ đợi cho những trường hợp không trả được kết quả lần 2. Vì lý do này, ACOG và SMFM khuyến nghị những thai phụ không nhận được kết quả xét nghiệm NIPS nên được tư vấn di truyền, siêu âm hình thái thai nhi, lựa chọn phương pháp sàng lọc khác hoặc chỉ định thủ thuật xâm lấn sử dụng dịch ối hoặc gai rau làm xét nghiệm karyotype [66]. Nghiên cứu có 18 mẫu thất bại không trả được kết quả NIPS, trong đó có 17 mẫu có nồng độ cffDNA thấp và 1 mẫu có dữ liệu nhiễu cao. 18 thai phụ đã được tư vấn thực hiện phương pháp sàng lọc khác và theo dõi thai cho đến khi sinh, cả 18 thai phụ đều sinh con khỏe mạnh bình thường, không phát hiện lệch bội NST.

Độ sâu trình tự và độ bao phủ là hai yếu tố có tính chất quyết định trong giải trình tự giải trình tự thế hệ mới (NGS). Độ sâu trình tự và độ bao phủ càng lớn kết quả giải trình tự càng chính xác [110]. Độ bao phủ thường được tính là độ sâu trình tự đoạn đọc thô hoặc đoạn đọc DNA được khớp, biểu thị độ bao phủ dự kiến trên cơ sở số lượng và độ dài của đoạn đọc DNA có chất lượng đọc cao trước hoặc sau khi lắp ráp với trình tự tham chiếu hg19. Trình tự những đoạn đọc DNA bắt cặp chỉ với một vị trí trên bộ gen hg19 được coi là trình tự duy nhất (unique reads - URs). Để ước tính số lượng tối thiểu của các lần đọc trình tự duy nhất cần thiết xác định số lượng NST, độ nhạy và độ đặc hiệu của thuật toán được lựa chọn phải đạt được hàng triệu lần đọc trình tự DNA. Dựa vào đó, số lần đọc trình tự duy nhất sau khi khớp và lọc phải đạt trên 2 triệu và tốt nhất là trên 3 - 4 triệu đoạn đọc DNA [111]. Kết quả nghiên cứu cho thấy các đoạn đọc DNA sau khi được lọc thỏa mãn đầy đủ các yêu cầu về chất lượng, trung bình có 4,4 triệu lần đọc trình tự duy nhất được lập bản đồ của toàn bộ lần đọc thô, dao động từ 2 triệu đến 17,7 triệu, đạt khoảng 78,0% (4,4 triệu đọc URs/5,6 triệu đọc thô), đảm bảo đủ số lượng đoạn đọc DNA, kết quả này cũng tương tự như trong nghiên cứu của Liao và cộng sự [103].

Trong nghiên cứu, phân bố điểm z-score trên 1231 mẫu của các NST 21, 18, 13 và NST X đều là phân bố chuẩn với số lần đọc trung bình trình tự duy nhất cao là 4,4 triệu. Điểm z-score cao nhất của NST 21, 18, 13 ở ngưỡng không phát hiện lệch bội 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 -2,9 đến 2,9. Kết quả nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Jeon và cộng sự cho kết quả z-score cao nhất của NST 21, 18 ở ngưỡng không phát hiện lệch bội lần lượt là 2,57; 2,46 [100].

Xét nghiệm NIPS phân tích cffDNA bằng thuật toán tin sinh học xác định lệch bội NST thai. Mặc dù các thuật toán ngày càng phát triển và có độ chính xác cao nhưng vẫn có khả năng có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả và yêu cầu số lượng đọc trình tự duy nhất đủ lớn để đạt được độ chính xác cao [9],[31],[112]. Trình tự đoạn đọc DNA được lập bản đồ và so sánh với bộ gen tham chiếu hg19 và xác định số lượng đoạn đọc DNA theo vị trí bộ gen. Sau khi hiệu chỉnh số liệu, điểm z-score trên mỗi NST sẽ được tính toán để xác định số lượng NST thai [8]. 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 [113]. Điểm z-score cao hơn với các mẫu trisomy và thấp hơn với các mẫu monnosomy. Độ tin cậy của xét nghiệm NIPS phụ thuộc vào độ chính xác của xét nghiệm như số lượng đoạn đọc DNA, mẫu tham chiếu được chọn, phương pháp chuẩn bị mẫu và phương pháp giải trình tự. Tất cả các yếu tố này được biểu hiện bằng điểm biến thiên (coefficient of variation - CV) của các mẫu đối chứng và nồng độ cffDNA đều ảnh hưởng đến điểm z-score [114]. Nghiên cứu của Sunshin Kim và cộng sự [115] đã giới thiệu một thuật toán mới dựa trên việc chọn các mẫu tham chiếu phù hợp bằng cách sử dụng điểm biến thiên theo hàm lượng GC và số lượng đoạn đọc DNA hoặc Lau và cộng sự [116] nghiên cứu với số lượng đoạn đọc DNA thấp hơn đã báo cáo hiệu quả lâm sàng của xét nghiệm NIPS dựa trên giải trình tự MPSS với độ bao phủ thấp trung bình $0,1 \times (\approx 300 \text{ bp})$, tạo ra số lượng trình tự duy nhất tối thiểu dưới 3,5 triệu. Kwon và cộng sự [117] phát minh ra một thuật toán mới sử dụng nhiều điểm z-score (Multi-Z) để xác định lệch bội NST thai cho thấy độ chính xác và hiệu quả cao hơn so với phương pháp giải trình tự thông thường ngay cả với độ bao phủ thấp.

Nghiên cứu cho kết quả 1172 mẫu xét nghiệm NIPS âm tính chiếm tỷ lệ 95,21%. 59 mẫu dương tính với lệch bội NST chiếm tỷ lệ 4,79% bao gồm: 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. Nghiên cứu hiệu quả xét nghiệm NIPS của Maxwell và cộng sự trên đối tượng thai phụ nguy cơ cao cũng phát hiện tỷ lệ lệch bội NST tương đồng [118]. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Shan Dan và cộng sự năm 2012 [6] gợi ý trên 95% thai phụ sẽ tránh được thủ thuật xâm lấn nếu được chỉ định xét nghiệm NIPS. Điều này không những làm giảm chi phí và giảm áp lực cho thai phụ, mà còn đưa ra giải pháp an toàn cho thai phụ và thai nhi, tránh được tai biến mất thai do thủ thuật xâm lấn. Nếu tất cả 1172 thai phụ được chỉ định thủ thuật xâm lấn thì có 2 - 3 thai phụ có khả năng mất thai, vì tỷ lệ mất thai từ thủ thuật xâm lấn (lấy mẫu gai rau hoặc hút dịch ối) là 0,11% - 0,22% [5]. Giả thuyết mất thai có thể tránh được nếu toàn bộ thai phụ có nguy cơ cao lệch bội NST được chỉ định xét nghiệm NIPS.

Nồng độ cffDNA trong huyết tương thai phụ là yếu tố chính quyết định hiệu suất xét nghiệm NIPS. Nếu có đủ nồng độ cffDNA trong mẫu và trong các giai đoạn kiểm soát chất lượng xét nghiệm, thì xét nghiệm có thể cung cấp số đếm chính xác của các đoạn đọc DNA. Nồng độ cffDNA trong mẫu xét nghiệm được chứng minh từ trên 10 tuần thai mới đưa ra kết quả xét nghiệm chính xác [119]. Nồng độ cffDNA trung bình trong huyết tương khoảng 10% [48] nhưng có sự khác biệt lớn về nồng độ cffDNA giữa các thai phụ [120]. Nồng độ cffDNA càng lớn, càng có khả năng phân biệt thai bình thường với thai lệch bội NST, đặc biệt là trisomy 21 [47]. Ngưỡng nồng độ cffDNA phát hiện trisomy trong một số nghiên cứu là $\geq 4\%$ [48],[49],[50]. Trong khi nghiên cứu khác báo cáo nồng độ cffDNA thấp nhất phát hiện trisomy là 3,5% [121]. Nghiên cứu của Scott và cộng sự báo cáo nồng độ cffDNA phải từ 3 - 4% để tỷ lệ âm tính giả là thấp nhất [122]. Trong các nghiên cứu trước đây, khoảng 1 - 3% thai phụ có cffDNA dưới 4%, đây là

nguyên nhân phổ biến nhất của kết quả xét nghiệm NIPS âm tính giả [49]. Trong trường hợp như vậy, tỷ lệ phát hiện đối với mẫu NIPS dương tính dưới 62,1% [123].

Nghiên cứu đã sử dụng phương pháp đếm số lượng đoạn đọc DNA trong mỗi vùng NST (thuật toán SeqFF) [46]. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ cffDNA có phân bố chuẩn và có xu hướng tăng dần theo tuổi thai tương ứng. Nồng độ cffDNA tăng nhẹ có ý nghĩa thống kê ở tuổi thai từ 10 - 20 tuần 6 ngày. Nồng độ cffDNA tăng nhanh có ý nghĩa thống kê ở tuổi thai \geq 21 tuần. Kết quả này tương tự như một số nghiên cứu của Zimmermann và cộng sự (2012) [57], Dar và cộng sự (2014) [124], Hudecova và cộng sự (2014) [51], Pergament và cộng sự (2014) [109] cho thấy nồng độ cffDNA tăng theo tuổi thai và sự khác biệt về nồng độ cffDNA là có ý nghĩa thống kê. Nghiên cứu của Wang và cộng sự năm 2013 cho thấy nồng độ cffDNA tăng lên trong suốt thời kỳ mang thai với mức tăng ban đầu là 0,1% mỗi tuần từ 10 - 20 tuần, sau tuần 21 tăng 1% mỗi tuần [108]. Nghiên cứu của Zhou và cộng sự năm 2015 báo cáo nồng độ cffDNA duy trì ổn định cho đến 21 tuần, tăng chỉ 1% từ 10 - 21 tuần. Sau 21 tuần, nồng độ cffDNA tăng nhanh, mỗi tuần tăng 1%. Từ sau 32 tuần, nồng độ cffDNA tăng nhiều, có thể được giải thích bởi sự tăng đột ngột thể tích của rau thai vào gần cuối thai kỳ [45]. Nghiên cứu của Kinning và cộng sự năm 2015 báo cáo nồng độ cffDNA tăng rất chậm từ 12,5 - 20 tuần thai (0,083%/tuần) có ý nghĩa thống kê, trong khi tăng gấp 10 lần từ sau 20 tuần (0,821%/tuần) [125]. Tuy nhiên một số nghiên cứu của Lun và cộng sự (2008) [32], Palomaki và cộng sự (2011) [68], Norton và cộng sự (2012) [48], Hestand và cộng sự (2018) [126], Suzumori và cộng sự (2016) [37], Brar và cộng sự (2013) [127], Y. Song và cộng sự (2015) [128]..., báo cáo nồng độ cffDNA từ 10 - 21 tuần có tăng nhẹ, tuy nhiên không phát hiện được sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, từ trên 21 tuần nồng

độ cffDNA tăng nhanh và sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê. cffDNA xuất hiện trong huyết tương thai phụ từ tuần thứ 6 thai kỳ và tăng theo tuổi thai có thể liên quan tới tăng thể tích của rau thai và nồng độ cffDNA tăng đột ngột vào gần cuối thai kỳ, đặc biệt là sau tuần thai thứ 32 (có thể là kết quả của quá trình chuẩn bị sinh). Như vậy, nghiên cứu đã xác định được nồng độ cffDNA và mối tương quan giữa nồng độ cffDNA và tuổi thai qua các thai kỳ ở thai phụ, cho thấy nồng độ cffDNA có xu hướng tăng dần theo tuổi thai.

Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ cffDNA thấp hơn so với các nghiên cứu khác (bảng 4.1).

Bảng 4.1. Nồng độ cffDNA qua các nghiên cứu trên thế giới

Tác giả	n	Tuần thai (w)	FF (%)
Ashoor. G (2012) [114]	300	11-13	11,4
Norton ME (2012) [48]	3.021	10-39	11,0
Lun (2008) [32]	35	12-14	9,7
		17-22	9,0
		38-39	20,4
Rava (2014) [129]	160	10-23	12,6
Y. SONG (2015) [128]	212	8-12w6d	8,54
Zhou (2015) [45]	22.650	≥10	9,0
Dar (2014) [124]	17.885	9-41	10,1
Suzumori (2016) [37]	6.850	10-20	13,7
Kinnings (2015) [125]	140.377	10-40	9,47
Scott (2018) [122]	5.267		11,6
H.H.Yến và CS (2020)	1.231	10-30w3d	7,79
		10-13w6d	7,44
		14-20w6d	7,76
		≥ 21w	10,85

Ghi chú: w: tuần thai; d:ngày; cffDNA: FF

Điều này có thể lý giải do các nghiên cứu khác nhau 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 cffDNA thu được từ các nghiên cứu cũng dao động khác nhau. Nhiều nghiên cứu báo cáo nồng độ cffDNA không khác nhau giữa các chủng tộc và dân tộc, tuổi mẹ, không có sự khác biệt về nồng độ cffDNA tuổi thai từ 10 - 22 tuần. Đa số nghiên cứu báo cáo có nồng độ cffDNA tỷ lệ thuận với tuổi thai ≥ 21 tuần, nồng độ cffDNA tăng nhanh sau 21 tuần, mỗi tuần tăng 1,0% [130]. 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 cffDNA thấp trong nghiên cứu. Tiếp theo, có thể liên quan đến khối lượng rau thai [43]. Ngoài ra, 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 cffDNA lưu hành trong huyết tương thai phụ. Nghiên cứu với cỡ mẫu chưa đủ lớn, chưa thể đại diện cho nồng độ cffDNA của thai phụ, cần có những nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để có thể xây dựng ngưỡng nồng độ cffDNA của thai phụ Việt Nam.

Nghiên cứu phát hiện mối tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và cân nặng của thai phụ, thai phụ có cân nặng dưới 60kg có nồng độ cffDNA cao hơn thai phụ có cân nặng trên 60kg. Kết quả nghiên cứu về mối tương quan giữa cffDNA và cân nặng hoặc BMI của thai phụ phù hợp với rất nhiều nghiên cứu trên thế giới như nghiên cứu của Ashoor và cộng sự (2013) [43], Revello và cộng sự (2016) [131], Scott và cộng sự (2018) [122], Dar và cộng sự (2014) [124].... cho thấy nồng độ cffDNA tỷ lệ nghịch với cân nặng hoặc BMI của thai phụ. Điều này đã được chứng minh bởi nghiên cứu của Suzumori và cộng sự (2016) cho thấy nồng độ cffDNA là 34,8% trên thai phụ nặng 34kg và 6,0% trên thai phụ nặng 115kg [37]. Nghiên cứu của Ashoor và cộng sự chứng minh nồng độ trung bình cffDNA là 11,7% trên

những thai phụ nặng 60kg, 6,0% trên thai phụ nặng 120kg và chỉ còn 3,9% trên thai phụ nặng 160kg [43]. Điều này có thể giải thích bởi hai yếu tố: tăng nồng độ DNA tự do của thai phụ sẽ làm giảm nồng độ DNA thai tự do [49]. Sự gia tăng nồng độ DNA tự do của thai phụ là do quá trình hoại tử và chết theo chương trình của tế bào mô mỡ ở thai phụ béo phì dẫn đến tăng nồng độ DNA tự do của thai phụ trong vòng tuần hoàn [132]. Sự giảm nồng độ cffDNA có thể liên quan đến việc tăng thể tích máu ở thai phụ béo phì dẫn đến nồng độ cffDNA bị pha loãng [133]. Do đó, BMI cao và béo phì có tương quan với tăng nguy cơ kết quả xét nghiệm NIPS thất bại. Yared và cộng sự cho thấy tỷ lệ thất bại xét nghiệm NIPS là 24,3% ở những thai phụ béo phì ($BMI \geq 30\text{kg/m}^2$) so với 3,7% ở thai phụ không béo phì. Do đó, có những hạn chế trong việc sử dụng xét nghiệm NIPS ở nhóm thai phụ béo phì [107].

Hơn nữa, kết quả nghiên cứu cho thấy tuổi thai phụ cũng có mối tương quan nghịch đến nồng độ cffDNA, 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 [131],[134], kết quả cho thấy nồng độ cffDNA giảm đáng kể khi tuổi thai phụ tăng. Nhiều báo cáo trước đây cũng đã chứng minh vai trò của tuổi thai phụ hoặc một số yếu tố khác đối với lệch bội NST có thể ảnh hưởng đến việc thực hiện sàng lọc trước sinh bằng phân tích cffDNA [135]. Tuy nhiên, nghiên cứu của các tác giả Kruckow và cộng sự [136], Ashoor và cộng sự (2012) [130], Zhou và cộng sự (2015) [45], Hestand và cộng sự (2018) [126], Hui L (2016) [137] cho thấy rằng cffDNA không có mối tương quan với tuổi thai phụ. Do đó, tác động của tuổi thai phụ lên cffDNA chưa đạt được sự đồng thuận và vẫn cần thêm dữ liệu. Tuy nhiên, các hướng dẫn ban đầu từ tất cả các hiệp hội lớn liên quan tới sản phụ khoa đã khuyến nghị hạn chế sử dụng xét nghiệm NIPS đối với những thai phụ ≥ 35 tuổi tại thời điểm sinh, tiền sử sinh con lệch bội trước đó, v.v. [65]. Tại Trung Quốc, thai phụ từ 35 tuổi trở

lên thường được tư vấn chẩn đoán xâm lấn. Tuy nhiên, ngày càng có nhiều chuyên gia tin rằng không phù hợp khi coi tuổi thai phụ là chỉ định duy nhất cho việc lựa chọn chẩn đoán xâm lấn. Do đó, các thầy thuốc lâm sàng và chuyên gia tư vấn viên nên tư vấn trước sinh cho các thai phụ về khả năng có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm NIPS do tuổi thai phụ và BMI thai phụ.

Các nghiên cứu sử dụng thuật toán đếm SeqFF đã đưa ra bằng chứng về ảnh hưởng của nồng độ cffDNA với lệch bội NST. Trong trường hợp thai phụ và thai nhi có bộ NST bình thường được coi là có số lượng NST giống hệt nhau. Khi thai mắc trisomy, nồng độ cffDNA sẽ cao hơn do số lượng đoạn đọc của NST đó tăng. Theo báo cáo của Benn và Cuckle, khi nồng độ cffDNA thấp, các đường cong phân phối của nồng độ cffDNA trường hợp bộ NST lưỡng bội và trisomy sẽ chồng lên nhau, do vậy sẽ làm giảm độ chính xác của xét nghiệm [138]. Tuy nhiên, sự khác biệt về nồng độ cffDNA có thể liên quan đến các loại lệch bội NST khác nhau. 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) [43], Rava và cộng sự (2014) [129] 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 Dar và cộng sự (2014) [124] trên nhóm lớn 28.739 thai phụ cũng cho kết quả tương đồng với nghiên cứu của Ashoor, Rava và cộng sự [43],[129] nhưng với tuần thai ≥ 9 tuần. 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 [37]. Palomaki và cộng sự báo cáo kết quả của một nghiên cứu bệnh chứng trên 4.664 thai phụ có nguy cơ cao trước khi làm chẩn đoán xâm lấn cho thấy nồng độ cffDNA ở thai mắc trisomy 21 cao hơn và thai mắc trisomy 18 thấp hơn so với thai không mắc trisomy, nồng độ cffDNA thai mắc trisomy 13 cao hơn so với thai không mắc trisomy [139]. 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 [125]. 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 [37]. Những nhận định này có thể liên quan đến tốc độ chu kỳ tế bào chậm trong các tế bào lá nuôi của rau thai trong trường hợp trisomy 13 và 18 góp phần làm giảm nồng độ cffDNA [43]. Nồng độ cffDNA cao hơn trên trisomy 21 có thể là do sự gia tăng quá trình chết theo chương trình của tế bào lá nuôi phôi [140]. Một số bằng chứng cũng chỉ ra stress oxi hóa dẫn đến tăng quá trình chết theo chương trình của tế bào rau thai và trisomy 21 được chứng minh làm tăng stress oxi hóa [141]. Nồng độ cffDNA cao hơn trong các trường hợp trisomy 21 có thể là một trong những lý do dẫn đến xét nghiệm NIPS phát hiện trisomy 21 có độ chính xác cao hơn trisomy 13 hoặc trisomy 18 [142]. Nghiên cứu bị giới hạn về số lượng mẫu trisomy phát hiện được ở nhóm thai phụ có tuổi thai < 21 tuần (trisomy 21 = 20, trisomy 18 = 7). Cần có thêm các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để có thể làm rõ mối tương quan giữa nồng độ cffDNA và lệch bội NST thai.

Trong nghiên cứu, nồng độ cffDNA có mối tương quan thuận với điểm z-score, khi nồng độ cffDNA tăng, z-score của trisomy 21, 18, 13 tăng mạnh. Tìm thấy mối tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và điểm z-score mẫu 45,X. Không tìm thấy mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ cffDNA và điểm z-score mẫu NIPS âm tính với trisomy 13, 18,

21 và lệch bội NST giới tính. Khi điểm z-cores cao, kết quả phát hiện lệch bội NST càng đáng tin cậy. Kết quả nghiên cứu phù hợp với báo cáo của Liao và cộng sự cho thấy 02/1700 trường hợp điểm z-score trong khoảng 2 - 3 không xác định được lệch bội NST, lấy mẫu lại cho kết quả nồng độ cffDNA thấp. Do vậy, nên chỉ định thủ thuật xâm lấn trong những trường hợp này [103]. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với quan sát của Xu-Ping Xu và cộng sự về mối liên quan thuận giữa nồng độ cffDNA và điểm z-score của trisomy 21, 18 và 13. Tuy nhiên, xu hướng này đã không quan sát thấy trên các mẫu âm tính với trisomy 21, 18, 13 [143]. Nghiên cứu của Dheedene và cộng sự [144], Suzumori và cộng sự [37] cũng cho kết quả tương đồng. Nồng độ cffDNA thấp dẫn đến điểm z-score thấp trong mẫu NIPS dương tính với trisomy và tăng nguy cơ kết quả xét nghiệm NIPS âm tính giả hoặc dương tính giả [145]. Do vậy, với kết quả xét nghiệm NIPS dương tính sử dụng phương pháp đếm, nhất là các trường hợp nồng độ cffDNA thấp và điểm z-score ở ngưỡng nguy cơ trung bình, để chẩn đoán xác định trisomy nhất thiết phải chỉ định thủ thuật xâm lấn (lấy mẫu gai rau hoặc dịch ối) làm xét nghiệm karyotype.

Xét nghiệm NIPS sử dụng phương pháp MPSS đã đạt được bước tiến vượt bậc trong những năm vừa qua. Tuy nhiên, cũng như các xét nghiệm sàng lọc trước sinh khác, xét nghiệm NIPS cũng bao gồm kết quả dương tính giả và âm tính giả, mặc dù các tỷ lệ này thấp hơn nhiều so với xét nghiệm sàng lọc trước sinh truyền thống (CFTS và triple test). Do vậy, với kết quả xét nghiệm NIPS dương tính cần tư vấn thực hiện các thủ thuật xâm lấn như lấy mẫu gai rau hoặc hút dịch ối làm xét nghiệm karyotype nhằm chẩn đoán xác định trước khi đưa ra quyết định đình chỉ thai nghén. Hiện nay, kết quả xét nghiệm karyotype từ dịch ối hoặc gai rau vẫn là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán trước sinh lệch bội NST thai, là cơ sở để so sánh và đánh giá giá trị của các kỹ thuật mới trong sàng lọc và chẩn đoán trước sinh. Tuy nhiên, thủ thuật xâm lấn như hút

dịch ối hoặc lấy mẫu gai rau có thể gây gây mất thai với tỷ lệ khoảng 0,11% - 0,22% [5].

59 mẫu NIPS dương tính với lệch bội NST thai được tư vấn thủ thuật xâm lấn hút dịch ối làm xét nghiệm karyotype, 08 mẫu có kết quả karyotype bình thường (46,XX; 46,XY) chiếm 13,6% và 51 mẫu trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính chiếm tỷ lệ 86,4%. Tỷ lệ mắc trisomy 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính tương đương với nhiều nghiên cứu khác [146].

Các bất thường số lượng NST gồm có 2 loại: dạng thuần (trong cơ thể chỉ có duy nhất một dòng tế bào bất thường) và dạng khảm (trong cơ thể ngoài dòng tế bào bất thường còn tồn tại dòng tế bào bình thường - 46 NST). Bất thường cấu trúc NST là do chất liệu di truyền của NST bị mất một phần, thừa một phần hoặc chuyển một đoạn sang NST khác hoặc quay 180°. Có rất nhiều dạng bất thường cấu trúc, tuy nhiên hay gặp nhất là bất thường cấu trúc kiểu chuyển đoạn (83,5%), đảo đoạn (8,6%), một số dạng bất thường khác chiếm tỷ lệ 7,9% [147]. Bất thường cấu trúc NST là nguyên nhân hàng đầu gây sảy thai, thai lưu liên tiếp trong 3 tháng đầu của thai kỳ.

Nghiên cứu sử dụng hệ thống giải trình tự Ion Torrent có giá trị phát hiện lệch bội NST thai vượt trội khi phát hiện được một số trường hợp đặc biệt liên quan đến bất thường số lượng (dạng khảm) và bất thường cấu trúc NST:

+ 01 trường hợp xét nghiệm NIPS dương tính với trisomy 18 có nồng độ cffDNA là 17% và điểm z-score là 22,41; kết quả xét nghiệm karyotype từ dịch ối phát hiện đột biến cấu trúc dạng 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)], kết quả xét nghiệm karyotype từ mẫu máu hai vợ chồng thai phụ cho kết quả 46,XX và 46,XY.

+ 01 trường hợp xét nghiệm NIPS dương tính với monosomy X có nồng độ cffDNA là 14% và điểm z-score là -8,41, xét nghiệm karyotype từ dịch ối cho kết quả đột biến cấu trúc NST X dạng isoXq [46,X,i(Xq)].

+ 01 trường hợp xét nghiệm NIPS dương tính với trisomy 21 có nồng độ cffDNA là 15,19% và điểm z-score là 10,03; xét nghiệm karyotype từ dịch ối cho kết quả khám 10% trisomy 21 và 90% dòng tế bào 46,XX (mos 47,XX,+21[8]/46,XX[72]), kết quả xét nghiệm karyotype từ máu cuống rốn thai nhi cũng cho kết quả tương tự.

Cả 3 trường hợp khi giải trình tự đều có số lượng trình tự duy nhất trên 4 triệu, nồng độ cffDNA và điểm z-score khá cao. Những phát hiện từ 03 trường hợp đặc biệt trên cho thấy xét nghiệm NIPS sử dụng hệ thống giải trình tự giải trình tự Ion Torrent là một phương pháp sàng lọc có hiệu quả không những phát hiện trisomy 21, 18, 13, lệch bội NST giới tính mà còn phát hiện được những trường hợp đặc biệt hiếm gặp như bất thường số lượng NST dạng khám (khám 10%) và bất thường cấu trúc NST.

1231 thai phụ tham gia nghiên cứu, sau giải trình tự phát hiện 59 mẫu có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính, trong đó 50 trường hợp có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính thật, 08 trường hợp xét nghiệm NIPS dương tính giả (08 thai phụ có kết quả karyotype bình thường) và 01 trường hợp xét nghiệm NIPS âm tính giả với 47,XYY (mẫu dương tính với 47,XXY, kết quả xét nghiệm karyotype là 47,XYY). Ngoài ra, 01 trường hợp kết quả xét nghiệm NIPS nguy cơ thấp nhưng xét nghiệm karyotype cho kết quả là thể tam bội (69,XXX).

Kể từ khi cffDNA được phát hiện lần đầu tiên trong huyết tương thai phụ vào năm 1997 [31], xét nghiệm NIPS phân tích cffDNA sàng lọc lệch bội NST thai ngày càng được ứng dụng rộng rãi tại nhiều nước trên thế giới. Nhờ

vậy, toàn bộ bộ NST thai có thể phát hiện được từ máu thai phụ bằng cách giải trình tự song song số lượng lớn đồng thời các đoạn DNA ngắn (MPSS) [8]. Dựa vào phương pháp MPSS, xét nghiệm NIPS được coi là xét nghiệm có độ chính xác cao phát hiện trisomy 21 và 18. Xét nghiệm NIPS có khả năng phát hiện cao hơn và có tỷ lệ dương tính giả thấp hơn so với các xét nghiệm sàng lọc trước sinh truyền thống (với tỷ lệ dương tính giả khoảng 5%) dựa trên sự kết hợp giữa tuổi thai phụ, siêu âm thai và định lượng các protein hoặc trong máu thai phụ [4]. Tuy nhiên, vì nhiều lý do khác nhau, xét nghiệm NIPS mặc dù được công nhận là xét nghiệm sàng lọc trước sinh có hiệu quả cao, nhưng vẫn không phải là xét nghiệm có thể thay thế xét nghiệm karyotype do xét nghiệm NIPS vẫn có kết quả dương tính giả và âm tính giả [148]. Tỷ lệ kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả thấp là một trong những ưu điểm lớn nhất của xét nghiệm. Xét nghiệm NIPS dương tính giả với tỷ lệ thấp có thể cho phép nhiều thai phụ tránh các thủ thuật xâm lấn không cần thiết để chẩn đoán xác định các kết quả xét nghiệm sàng lọc trước sinh truyền thống không chính xác [149]. Theo phân tích tổng hợp của Gil và cộng sự cho thấy tỷ lệ dương tính giả xét nghiệm NIPS từ 0,1 - 0,2%. Xét nghiệm NIPS có giá trị tiên đoán âm cao (> 99%) và điều này rất có ý nghĩa giúp làm giảm đáng kể tỷ lệ thai phụ phải thực hiện các thủ thuật chẩn đoán xâm lấn. Trong 1 phân tích tổng hợp 22 nghiên cứu từ năm 2013 – 2016 [7], báo cáo 182/206 trường hợp dương tính giả và 24/206 trường hợp âm tính giả. Những lý do chính của kết quả xét nghiệm NIPS không phù hợp với kết quả xét nghiệm karyotype bao gồm khám khu trú rau thai (CPM), khám thai phụ, biến thể số lượng bản sao của mẹ (CNV), mất thai trong thai đôi, thai phụ mắc ung thư ác tính, khám thai thực sự (TFM) và thậm chí do sai sót trong quá trình lấy mẫu và thao tác từ phòng xét nghiệm [142]. CPM là một hiện tượng sinh học tương đối phổ biến chiếm tỷ lệ 1% đến 2% trên thai phụ trong thai kỳ 1 [73]. Vì cfDNA có nguồn gốc từ tế

bào lá nuôi phôi [35], phần lớn kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả và âm tính giả được báo cáo nguyên nhân do CPM, có liên quan đến trisomy 13, 18, 21 và các NST khác [150].

Ngoài ra, kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả với trisomy 13 tương đối cao, có thể liên quan đến kích thước của NST 13 hoặc hàm lượng GC trên NST 13. Nghiên cứu của Zhang và cộng sự trên 146.958 thai phụ cho thấy tỷ lệ phát hiện của xét nghiệm NIPS với trisomy 18 và 13 thấp hơn so với trisomy 21 [151]. Nguyên nhân có thể liên quan đến sai lệch GC gây ra bởi quá trình chuẩn bị mẫu hoặc giải trình tự. Sự khác biệt về hàm lượng GC của các NST kết hợp với sai lệch GC liên quan đến quá trình giải trình tự đã giải thích mối tương quan đáng kể giữa độ bao phủ và hàm lượng GC tương ứng. NST 13 có hàm lượng GC tương đối thấp, quá trình PCR và giải trình tự trải qua bước làm giàu NST với hàm lượng GC cao hơn, dẫn đến độ bao phủ thấp cho NST 13 và do đó có mối tương quan nghịch giữa độ bao phủ và hàm lượng GC trong các NST [152]. Ngoài ra, nồng độ cfDNA và điểm z-score có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ dương tính giả xét nghiệm NIPS. Nghiên cứu phát hiện 05 mẫu dương tính giả, trong đó 03 mẫu trisomy 13; 02 mẫu trisomy 18 đều có điểm z-score đều ở ngưỡng $3 \leq z\text{-score} < 5$ và có nồng độ cfDNA trong khoảng 5,0 - 9,0%, phù hợp với nghiên cứu của Yuan và Cộng sự [153]. Hầu hết các mẫu xét nghiệm NIPS dương tính thật đều có điểm z-score > 5 , kết quả này hoàn toàn phù hợp với báo cáo của Sikkema và cộng sự [145]. Với điểm z-score ≥ 3 không phát hiện mẫu dương tính giả với trisomy 21. Khi tăng nhẹ ngưỡng phát hiện của NST 13 và 18 thì tỷ lệ phát hiện trisomy sẽ là 100,0%, không có kết quả dương tính giả. Tuy nhiên, nghiên cứu lựa chọn ngưỡng phát hiện đối với trisomy 21, 18, 13 là điểm z-score ≥ 3 để có thể tránh có kết quả âm tính giả cho xét nghiệm phát hiện trisomy 21. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với Palomaki và cộng sự năm 2012 và Jensen

và cộng sự năm 2013 [50],[154]. Nghiên cứu của nghiên cứu của Jensen và cộng sự năm 2013 đã sử dụng ngưỡng điểm z-score = 3 cho trisomy 21 và 3,95 cho trisomy 18 và trisomy 13 cho kết quả dương tính giả thấp $\leq 0,09\%$ cho từng NST 21, 18, 13 [154].

Nghiên cứu của Liao và cộng sự đánh giá hiệu quả sàng lọc lệch bội NST bằng công nghệ giải trình tự bán dẫn đưa ra ngưỡng điểm z-score để giảm nguy cơ xét nghiệm NIPS âm tính giả và dương tính giả. Xét nghiệm NIPS âm tính khi $|z\text{-score}| < 2$, trong khi xét nghiệm NIPS dương tính được xác định là $|z\text{-score}| > 4$ [103]. Nghiên cứu của Yuan và cộng sự cho thấy khi xét nghiệm NIPS có điểm z-score ≥ 9 có độ chính xác cao hơn z-score trong khoảng $3 \leq z\text{-score} < 5$ hoặc $5 \leq z\text{-score} < 9$. Kết quả NIPS dương tính giả hay gặp trong trường hợp điểm z-score trong khoảng $3 \leq z\text{-score} < 5$ thường do nguyên nhân CPM [153]. Mặc dù giá trị tiên đoán dương xét nghiệm NIPS khi điểm z-score trong khoảng $5 \leq z\text{-score} < 9$ là 88,24% cao hơn điểm z-score trong khoảng $3 \leq z\text{-score} < 5$ là 16,67%, xét nghiệm NIPS vẫn không được coi là xét nghiệm chẩn đoán do tỷ lệ xét nghiệm NIPS dương tính giả tương vẫn đối cao là 11,76%. Tuy nhiên, kết quả xét nghiệm NIPS dương tính khi điểm z-score ≥ 9 rất có ý nghĩa tiên đoán chính xác trisomy 13, 18 và 21 [153]. Nghiên cứu của Dheedene và cộng sự cũng đưa ra ngưỡng nguy cơ phát hiện trisomy khi điểm z-score > 5 . Khi điểm z-score trong khoảng 3 - 5 được coi là nguy cơ trung bình, cần phân tích mẫu lặp lại trước khi báo cáo kết quả. Nếu mẫu lặp lại có điểm z-score > 3 , mẫu được báo cáo là nguy cơ cao với trisomy [144].

Hướng dẫn của Hội Thai phụ khoa của Hoa Kỳ (ACOG) năm 2015, cho thấy nồng độ cffDNA thấp từ 1% đến 8% là nguyên nhân chính của các trường hợp sàng lọc thất bại, phụ thuộc vào hệ thống giải trình tự và sai sót từ phòng xét nghiệm [66]. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với nghiên cứu về

cách tiếp cận đánh giá nguy cơ lệch bội thai của Wright và cộng sự cho thấy tỷ lệ phát hiện lệch bội NST tăng từ 62,0% với nồng độ cffDNA là 4,0% tới 100,0% với nồng độ cffDNA $\geq 9,0\%$, chứng tỏ nồng độ cffDNA càng cao thì tỷ lệ phát hiện xét nghiệm NIPS càng tăng [123].

Nghiên cứu phát hiện 02 trường hợp NIPS dương tính giả với monosomy X (45,X); 01 trường hợp dương tính giả với 47,XYY và 01 trường hợp âm tính giả với 47,XYY. Cả 03 trường hợp dương tính giả đều có z-score thấp < -5 . 01 trường hợp xét nghiệm NIPS âm tính giả với 47,XYY, nồng độ cffDNA là 22%, điểm z-score NST X là 5,38; thai nam với tín hiệu NST Y cao là 0,001043 (bình thường, với tín hiệu NST Y có ngưỡng $\geq 0,0003$ được xác định là giới tính nam). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Li và cộng sự phát hiện 02 mẫu xét nghiệm NIPS dương tính với 47,XXY, kết quả karyotype là 47,XYY. Theo nhiều nghiên cứu, kiểu NST XXY và XYY rất khó đánh giá trong xét nghiệm NIPS [155].

Các phương pháp sàng lọc trước sinh truyền thống không sàng lọc lệch bội NST giới tính, lệch bội NST giới tính thai thường được phát hiện được qua xét nghiệm karyotype trên thai phụ có nguy cơ cao lệch bội NST thai [156]. Xét nghiệm NIPS không những sàng lọc trisomy 21, 18 và 13, mà còn có khả năng sàng lọc lệch bội NST khác, bao gồm cả các lệch bội NST giới tính. Các triệu chứng lệch bội NST giới tính nói chung là nhẹ, ngoại trừ monosomy X gây sảy thai tự nhiên, phát hiện do kết quả siêu âm có độ mờ da gáy cao (NT) trong thai kỳ đầu hoặc dị sản bạch mạch dạng nang (cystic hygroma/hydrops) trong thai kỳ 2. Trong những trường hợp như vậy, chỉ định thủ thuật xâm lấn là cần thiết thay vì tư vấn xét nghiệm NIPS nhằm phát hiện monosomy X. Kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả với monosomy X cao hơn các loại lệch bội NST giới tính khác [157]. Nguyên nhân có liên quan đến hàm lượng GC thấp của NST X và sự giống nhau về trình tự giữa NST X và

Y, dẫn đến việc dễ gây nhầm lẫn khi lập bản đồ (mapping). Hơn nữa, 2 NST giới tính được đánh giá đồng thời (NST giới tính của thai phụ được coi là bình thường trong khi NST giới tính của thai vẫn chưa biết). Ngoài ra, kích thước của NST Y nhỏ hơn các NST khác cũng có thể dẫn đến sự thay đổi lớn trong các lần đếm các đoạn DNA. Bất thường NST của thai phụ hoặc khám thai cũng có thể hạn chế việc phát hiện lệch bội NST giới tính [158]. Một số nghiên cứu đã chứng minh có sự mất NST X theo cấp số nhân tuổi thai phụ, làm tăng tỷ lệ khám của thai phụ với monosomy X [159]. Wang và cộng sự nhận thấy rằng khoảng 8,6% các trường hợp NIPS dương tính với lệch bội NST giới tính nguyên nhân do thai phụ có khám NST giới tính [76]. Do đó, tỷ lệ kết quả xét nghiệm NIPS không phù hợp với monosomy X tăng theo tuổi thai phụ.

Khi kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với lệch bội NST giới tính, nên chỉ định làm xét nghiệm karyotype từ mẫu máu thai phụ và yêu cầu phòng xét nghiệm tế bào đếm ít nhất 30 cụm tế bào, vì phân tích này có thể loại trừ khám > 10% [160].

Tỷ lệ dương tính giả cao của xét nghiệm NIPS cũng có thể liên quan đến hiện tượng mất một thai trong thai đôi (Vanishing Twin), vì vậy với các trường hợp kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả nên tư vấn thủ thuật xâm lấn cho thai phụ.

Nghiên cứu có 1 trường hợp kết quả xét nghiệm karyotype là thể tam bội (69,XXX) nhưng có kết quả xét nghiệm NIPS âm tính, nguyên nhân có thể do phương pháp giải trình tự gen MPSS cho phép xác định chính xác từng loại trisomy, dựa vào phương pháp đếm định lượng là so sánh số lượng trình tự đoạn đọc DNA tương đối từ mỗi NST quan tâm với NST tham chiếu. Do vậy, sử dụng phương pháp MPSS trong sàng lọc lệch bội NST có thể gặp bất

lợi trong việc phát hiện thể tam bội, vì thể tam bội là ảnh hưởng lên tất cả các NST như nhau [161].

Nghiên cứu cho thấy độ nhạy (tỷ lệ dương tính thật) và độ đặc hiệu (tỷ lệ âm tính thật) là 100,0% và 99,6% với khoảng tin cậy 95% cho độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 92,1 - 100% và 99,0 - 99,9% cho cả 3 loại trisomy 21, 18, 13. Trong đó, độ nhạy cho trisomy 18, trisomy 13 có khoảng tin cậy 95% tương đối rộng tương ứng là 75,0 - 100,0% và 16,0 - 100,0%. Kết quả nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Francesco và cộng sự báo cáo độ nhạy và độ đặc hiệu trên hệ thống Ion Torrent là 100,0% với khoảng tin cậy 95% cho độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 84,0 - 100% và 96,0 - 100% cho cả 3 loại trisomy 21, 18, 13 khi so sánh với kết quả karyotype từ dịch ối hoặc gai rau. Mặc dù độ nhạy cho trisomy 13 và 18 là 100%, nhưng khoảng tin cậy 95% rộng tương ứng là 39,8 - 100,0% và 2,5 - 100,0% vì số lượng mẫu trong nghiên cứu thấp [162]. Nghiên cứu của Liao và cộng sự trên hệ thống Ion Torrent, sử dụng ngưỡng điểm z-score ≥ 3 cho thấy độ nhạy 99,94% cho trisomy 21 và 100,0% cho trisomy 18 và trisomy 13. Độ đặc hiệu là 99,46% cho trisomy 21, 99,24% cho trisomy 18, và 100,0% cho trisomy 13 [103]. Nghiên cứu của Zhang và cộng sự trên hệ thống giải trình tự Illumina báo cáo độ nhạy chung là 99,17% đối với trisomy 21, 98,24% đối với trisomy 18 và 100,0% đối với trisomy 13 và độ đặc hiệu là 99,95% đối với trisomy 21, 99,95% đối với trisomy 18 và 99,96% đối với trisomy 13 [151]. Sử dụng hệ thống giải trình tự Illumina, Zhou và cộng sự cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm NIPS khi phát hiện trisomy 21, 18 và 13 là 100,0% và 99,9% [163]. Nghiên cứu phân tích tổng hợp trên các hệ thống giải trình tự khác nhau cho thấy độ nhạy gộp cho trisomy 21, 18 lần lượt là 99,8% (95% CI: 98,1 - 99,9%) và 97,7% (95% CI: 98,1 - 99,9%). Độ nhạy gộp cho trisomy 13 là 97,5% (81,9 - 99,7%). Độ nhạy gộp cho cả 3 loại trisomy là 99,9% (95%

CI: 99,8 - 99,9%) [164]. Nghiên cứu của Xue và cộng sự trên số lượng lớn thai phụ trên hai hệ thống giải trình tự Ion Torrent và Illumina báo cáo độ nhạy và độ đặc hiệu cao cho trisomy 21, 18, 13 [96].

Giá trị tiên đoán âm cho cả 3 loại trisomy 21, 18, 13 là 100,0% (95% CI: 100,0 - 100,0%). Kết quả nghiên cứu tương đồng với kết quả của Sekelska và cộng sự năm 2019 cho thấy giá trị tiên đoán âm cho cả 3 loại trisomy 21, 18, 13 là 99,99% [165]. Phân tích tổng hợp của Iwarsson và cộng sự năm 2017 trên đối tượng thai phụ nguy cơ trung bình và nguy cơ cao đưa ra tỷ lệ kết quả xét nghiệm NIPS âm tính giả chiếm tỷ lệ thấp chỉ 0,01% trong phần lớn các nghiên cứu [164].

Trong nghiên cứu, giá trị tiên đoán dương (PPV) trisomy 21 cao nhất là 100,0%, khoảng tin cậy 95% là 88,0 - 100,0%, trisomy 18 là 87,0%, khoảng tin cậy 95% là 60,0 - 98,0%, tuy nhiên PPV trisomy 13 tương đối thấp là 40,0%, khoảng tin cậy 95% rộng là 5,0 - 85,0%. Nghiên cứu của Zhou và cộng sự cũng cho kết quả PPV tương tự với trisomy 21, 18, 13 lần lượt là 94,7% (95% CI: 94,2 - 95,2%); 83,3% (95% CI: 82,9 - 83,7%); 50% (95% CI: 48,9 - 51,1%) [163]. Nghiên cứu của Petersen và cộng sự năm 2017 cho thấy PPV trisomy 13, 18, 21 lần lượt là 84,0%; 76,0%; 45,0% [166]. Norton và cộng sự đưa ra PPV trisomy 21 là 80,9% (95% CI: 66,7 - 90,30%), trisomy 18 là 90,0% (95% CI: 55,5 - 99,70%) và trisomy 13 là 50% (95% CI: 6,8 - 93,2%) [69]. Mặc dù độ nhạy của xét nghiệm NIPS đối với trisomy 21, 18 và 13 cao, nhưng PPV khác nhau với từng loại trisomy, PPV cao với trisomy 21 và 18, thấp hơn với trisomy 13. PPV tỷ lệ thuận với độ đặc hiệu của xét nghiệm và được xác định bởi tần suất xuất hiện của lệch bội NST đó tại tuổi thai mà thai phụ thực hiện xét nghiệm. Tần suất xuất hiện trisomy 21, 18, 13 ở phụ nữ 35 tuổi với thai 10 tuần lần lượt là 1:185, 1:470, 1:1.500, giả sử độ nhạy và độ đặc hiệu là 99,9% cho mỗi lệch bội NST, PPV sẽ lần lượt là 84%,

68%, 40% với trisomy 21, 18, 13 [146]. PPV phát hiện trisomy 13 là thấp nhất, điều này có thể liên quan đến tần xuất trisomy 13 thấp hơn có ý nghĩa so với trisomy 21 và trisomy 18. Số trường hợp trisomy 13 trong mỗi nghiên cứu là tương đối thấp và dẫn đến PPV khác nhau giữa các nghiên cứu [69]. Những phát hiện này cho thấy sự cần thiết phải tư vấn về kết quả xét nghiệm NIPS cho thai phụ. Điều quan trọng là phân biệt được sự khác biệt giữa độ đặc hiệu và PPV. Ví dụ: không nên coi rằng xét nghiệm có độ đặc hiệu trên 99,0% sẽ có tỷ lệ dương tính giả dưới 1,0%. Như dữ liệu trong nghiên cứu này và một số nghiên cứu khác có thể thấy, xét nghiệm NIPS có PPV trisomy 13 và lệch bội NST giới tính dưới 60,0%. Đối với một cặp vợ chồng có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với trisomy 13 hoặc lệch bội NST giới tính, điều quan trọng nhất là phải tư vấn để họ hiểu rằng khả năng thai của họ thực sự mắc trisomy 13 hoặc lệch bội NST giới tính là dưới 60,0%. Một kết quả siêu âm bình thường sẽ làm giảm khả năng mắc trisomy 13 hoặc lệch bội NST giới tính xuống thấp hơn nữa. Điều này rất khác với việc thai phụ được thông báo rằng 99,0% khả năng thai bị ảnh hưởng và có thể dẫn đến một quyết định thực hiện thủ thuật xâm lấn trước khi thực hiện thêm bất kỳ phương pháp sàng lọc nào khác [115].

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% (95% CI: 0,0 - 97,5%); tiếp theo là 45,X chiếm 50,0% (95% CI: 6,76 - 93,2%), 47,XXY là 66,7% (95% CI: 9,43 - 99,2%); PPV cao nhất là 47,XXX là 100,0% (95% CI: 2,5 - 100%). 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 [167]. ACOG chỉ ra độ nhạy và độ đặc hiệu phát hiện SCAs là 91,0% và 99,6% [113],[168]. Trong một phân tích tổng hợp, tỷ lệ phát hiện monosomy X và SCAs khác là 93,0% và 90,3%. Tuy nhiên, tỷ lệ phát hiện cũng rất khác nhau giữa các nghiên cứu khác nhau trong nghiên cứu phân tích này. Tỷ lệ phát hiện monosomy X thấp nhất và cao nhất là 66,7% và 100,0% [7]. Y.Xue và cộng sự nhận thấy rằng độ đặc hiệu và PPV với SCAs là 99,9% và 57,1% khi sử dụng hệ thống giải trình tự Ion Torrent và 99,78% và 36,9% khi sử dụng hệ thống giải trình tự của Illumina [169], chứng tỏ giải trình tự trên hệ thống Ion Torrent có giá trị phát hiện SCAs hiệu quả cao hơn hệ thống Illumina.

Một số nghiên cứu báo cáo PPV phụ thuộc vào từng loại SCAs khác nhau dao động từ 20,0 - 40,0%, cao nhất là 50,0% [115],[124]. Nghiên cứu của Yao và cộng sự cũng cho kết quả tương đồng, chỉ ra PPV cho SCAs là 54,17%; PPV với 45,X là 40%; 47,XXY là 42,86% và cao nhất là 47,XXX chiếm tỷ lệ 70% [170]. Nghiên cứu của Cheung và cộng sự cho thấy tỷ lệ dương tính giả với monosomy X là 62%, cao hơn với 47,XXX; 47,XXY; 47,XYY [171]. Zheng và cộng sự chứng minh tỷ lệ xét nghiệm NIPS dương tính thật SCAs là 54,55%. Trong số SCAs, PPV cho monosomy X (hội chứng Turner) là thấp nhất (44,44%). PPV cho các loại SCAs khác tương đối chính xác [172]. Kết quả 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,XYY, 80,0% với 47,XXX và cao nhất là 47,XXY với 92,31% [96]. Nghiên cứu trên 50.301 thai phụ thực hiện xét nghiệm NIPS phát hiện lệch bội NST thai cho thấy PPV với SCAs là 32,42%, trong đó PPV cho monosomy X thấp nhất là 18,39%, tiếp theo là 47,XXY với 39,29%; 47,XXX là 44,4% và cao nhất là 47,XYY với 75,0% [173].

PPV với SCAs trong nghiên cứu có sự khác biệt so với nhiều nghiên cứu khác [7],[96],[166],[170],[173], có thể liên quan đến số lượng mẫu, tỷ lệ mắc bệnh trong quần thể nghiên cứu thấp, thiết kế nghiên cứu và số lượng thai phụ thực hiện xét nghiệm karyotype trong nghiên cứu. Trong một số nghiên cứu lớn, chỉ có 1/3 thai phụ có xét nghiệm NIPS dương tính được theo dõi lâm sàng trong các nghiên cứu. PPV của một xét nghiệm sẽ thấp hơn trong quần thể có tỷ lệ mắc bệnh thấp. PPV với 47,XYY là thấp nhất, do trong nghiên cứu chỉ phát hiện được 1 trường hợp, nghiên cứu chỉ có thể đưa ra nhận xét là PPV thấp nhất trong nghiên cứu, không đại diện cho quần thể. Trường hợp monosomy X thường có dấu hiệu chỉ điểm là độ mờ da gáy (NT), khi kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với 45,X, nếu kết quả siêu âm có NT bình thường thì nhiều khả năng thai có NST giới tính bình thường (46,XX). Trong trường hợp siêu âm có $NT \geq 3\text{mm}$, nên tư vấn thai phụ thực hiện thủ thuật xâm lấn làm xét nghiệm karyotype, thay vì tư vấn xét nghiệm NIPS. Do vậy, tỷ lệ phát hiện monosomy X sẽ thấp hơn do nhóm thai phụ có $NT \geq 3\text{mm}$ đã được thực hiện xét nghiệm karyotype mà không xét nghiệm NIPS.

Trong các nghiên cứu, xét nghiệm NIPS dường như tiên đoán chính xác hơn 47,XXX và 47,XXY, nhưng kém hơn trong monosomy X. Có thể giải thích do một số lý do sau: (i) NST X và Y có 58 gen tương đồng, trong đó 29 gen nằm ở hai đầu của NST X và Y - vùng pseudoautosomal. Vùng pseudoautosomal bao gồm hai đoạn ngắn ở hai đầu của NST giới tính. Sai sót trong quá trình giải trình tự các vị trí này trên NST X và Y có thể dễ dàng xảy ra do phương pháp MPSS chỉ giải trình tự các đoạn DNA ngắn; (ii) Nồng độ trung bình cfDNA chỉ chiếm khoảng 10,0 - 20,0% [32]. Bất thường NST của thai phụ cũng có thể dẫn đến kết quả xét nghiệm NIPS không phù hợp với kết quả chẩn đoán xâm lấn [158]. Tất cả những yếu tố trên cũng làm tăng tỷ lệ xét

nghiệm NIPS dương tính và tăng số lượng thai phụ phải thực hiện thủ thuật xâm lấn đối với xét nghiệm NIPS.

Các nghiên cứu đều cho thấy rằng xét nghiệm NIPS phát hiện lệch bội NST giới tính (SCAs) có độ chính xác thấp hơn so với lệch bội NST thường [174],[175]. Gil và cộng sự năm 2015 báo cáo xét nghiệm NIPS có tỷ lệ phát hiện và tỷ lệ dương tính giả lần lượt là 99,2% và 0,09% với trisomy 21; 96,3% và 0,13% với trisomy 18; 91,0% và 0,13% với trisomy 13; 90,3% và 0,23% với monosomy X và 93,0% và 0,14% với lệch bội NST giới tính khác với monosomy X [7]. Các trường hợp xét nghiệm NIPS dương tính với SCAs dựa trên phương pháp MPSS được cho là nguyên nhân do khản thai sẽ khó khẳng định bằng xét nghiệm karyotype nếu các tế bào hoặc mô không đủ số lượng để phân tích. Hơn nữa, trong trường hợp khản giới hạn rau thai hoặc khản thai phụ đều có thể dẫn đến kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với SCAs dựa trên phương pháp MPSS, điều này có thể được xác nhận bằng cách phân tích sâu hơn về mô rau thai hoặc tế bào bạch cầu thai phụ [170]. Nghiên cứu với cỡ mẫu còn thấp, các trường hợp lệch bội NST giới tính phát hiện được chỉ có 9 trường hợp, trong đó 3 trường hợp xét nghiệm NIPS dương tính giả và 1 xét nghiệm NIPS trường hợp âm tính giả, do vậy có sự khác biệt về PPV so với các nghiên cứu khác.

Khoảng 99,0% monosomy X bị sảy thai tự nhiên trong thai kỳ 1, trong khi hầu hết lệch bội NST giới tính khác cho thấy không có triệu chứng lâm sàng rõ ràng hoặc bất thường trên siêu âm [176]. Mặc dù tỷ lệ mắc SCAs của mỗi loại lệch bội tương đối hiếm, nhưng tỷ lệ SCAs tích lũy xảy ra khoảng 0,3% tổng số trường hợp sinh sống [177]. Thật vậy, tỷ lệ trẻ sinh sống mắc lệch bội NST giới tính cao hơn rất nhiều so với lệch bội NST thường (trisomies 21, 18 hoặc 13). Điều này phản ánh thực tế rằng SCAs hiếm khi

gây chết người và các đặc điểm kiểu hình của SCAs ít nghiêm trọng hơn các lệch bội NST khác. Theo tổ chức y tế thế giới (WHO), SCAs chiếm gần 50,0% bất thường NST ở người. WHO cũng báo cáo tỷ lệ 1: 400 người có kiểu hình bình thường (0,25%) là SCAs [178]. Các can thiệp sớm như liệu pháp hormone và liệu pháp thay thế hormone đã được chứng minh là cải thiện biến chứng cho những trẻ mắc 45,X hoặc 47,XXY [179]. Đối với thai trisomy X có thể liên quan đến thai chậm phát triển, rối loạn nhận thức, khuyết tật về học tập và rối loạn tâm lý, do vậy phát hiện sớm trisomy X giúp gia đình và xã hội có thể lập kế hoạch giáo dục và chăm sóc y tế sớm cho trẻ [180]. Vì vậy, sàng lọc và chẩn đoán trước sinh SCAs có thể góp phần đưa ra những biện pháp chăm sóc và điều trị cho trẻ SCAs kịp thời [181].

ACOG và SMFM cho thấy tất cả các thai phụ nên được tư vấn lựa chọn sàng lọc lệch bội NST hoặc xét nghiệm chẩn đoán các rối loạn di truyền của thai nhi, bất kể tuổi của thai phụ [182]. ACMG khuyến cáo thầy thuốc chuyên khoa nên tư vấn trước khi xét nghiệm NIPS cho tất cả thai phụ, về việc sử dụng sàng lọc mở rộng cho SCAs [183].

Kết quả nghiên cứu cho thấy xét nghiệm NIPS có thể được sử dụng để sàng lọc SCAs, tuy nhiên, hiệu quả của xét nghiệm sàng lọc SCAs trong nghiên cứu hiện thấp hơn so với xét nghiệm karyotype. Do vậy, nên tư vấn cho các thai phụ về lợi ích và hạn chế của xét nghiệm NIPS trong sàng lọc SCAs. Thai phụ nên được giải thích về những lý do tại sao xét nghiệm NIPS sàng lọc SCAs lại có tỷ lệ dương tính giả cao. Những thai phụ này cũng nên được thông báo về những lợi ích và rủi ro khi lựa chọn xét nghiệm chẩn đoán.

Mặc dù có nhiều tranh cãi xung quanh việc sàng lọc trước sinh bằng cffDNA, nhưng việc tư vấn trước và sau xét nghiệm NIPS là thực sự cần thiết,

giúp thai phụ có thể hiểu rõ hơn về lựa chọn mà họ đưa ra. Khi kết quả xét nghiệm NIPS cho thấy nguy cơ cao SCAs, thai phụ nên được tư vấn bởi chuyên gia di truyền. Nên chỉ định chẩn đoán xâm lấn khi kết quả xét nghiệm NIPS dương tính với SCAs.

Một lợi ích nữa của xét nghiệm NIPS dựa trên MPSS là phát hiện được các lệch bội NST khác hiếm gặp. Tuy nhiên, những kết quả này rất hiếm, và hầu hết liên quan đến khảm giới hạn ở rau thai (CPM) hoặc liên quan đến sảy thai, hoặc hiếm hơn là trường hợp thai chậm phát triển trong tử cung. Lợi ích lâm sàng trong việc phát hiện các trisomy hiếm gặp này một lần nữa lại làm tăng thêm tỷ lệ thủ thuật xâm lấn từ 0,1 - 0,78% [184].

Xét nghiệm NIPS sàng lọc phần lớn các lệch bội NST thường gặp, giúp giảm số lượng thai phụ phải thực hiện thủ thuật xâm lấn do sàng lọc trước sinh truyền thống có nguy cơ cao từ xét nghiệm huyết thanh mẹ, độ mờ da gáy, siêu âm bất thường hình thái... Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá giá trị của xét nghiệm NIPS so với xét nghiệm sàng lọc trước sinh truyền thống như sàng lọc huyết thanh thai phụ, tuổi thai phụ trên 35, siêu âm bất thường (độ mờ da gáy và siêu âm có hình thái bất thường)... để bước đầu có thể giúp ích cho thầy thuốc lâm sàng có thêm định hướng, tư vấn xét nghiệm NIPS phù hợp cho từng đối tượng thai phụ, lựa chọn những thai phụ cần chỉ định thủ thuật xâm lấn và những thai phụ nên tư vấn xét nghiệm NIPS.

Trong tổng số 1231 thai phụ xét nghiệm NIPS, số lượng thai phụ được chỉ định xét nghiệm NIPS vì sàng lọc huyết thanh mẹ nguy cơ cao chiếm tỷ lệ cao nhất, số lượng thai phụ liên quan đến siêu âm bất thường hình thái chiếm tỷ lệ thấp nhất. Tuy nhiên, PPV do siêu âm hình thái bất thường chiếm tỷ lệ cao nhất và PPV do sàng lọc huyết thanh mẹ nguy cơ cao chiếm tỷ lệ thấp

nhất. Đặc biệt, nhóm thai phụ có hình ảnh siêu âm kết hợp giữa hình thái bất thường và độ mờ da gáy (NT) $\geq 3,5\text{mm}$ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ cao nhất. Trong nhóm có NT cao, tỷ lệ thai phụ có NT $\geq 4\text{mm}$ có kết quả xét nghiệm NIPS dương tính chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp theo là thai phụ có NT từ 3 - 3,9mm. Xét nghiệm NIPS dương tính liên quan đến chỉ định huyết thanh mẹ nguy cơ cao trisomy 21 cho thấy với nguy cơ $\geq 1/10$, xét nghiệm NIPS dương tính cho tỷ lệ cao nhất. Kết quả của nghiên cứu hoàn toàn phù hợp với báo cáo của Persico và cộng sự năm 2016 trên 249 thai phụ làm xét nghiệm NIPS trên nhóm có xét nghiệm sàng lọc trước sinh kết hợp thai kỳ 1 (CFTS) nguy cơ $\geq 1/250$, phát hiện 35/36 trường hợp trisomy 21, 13/13 trường hợp trisomy 18, 05/05 trường hợp trisomy 13 và 03/04 trường hợp SCAs. Thực hiện thủ thuật xâm lấn trên 2 nhóm thai phụ có nguy cơ cao sàng lọc huyết thanh: nhóm 1 với nguy cơ $\geq 1/10$ hoặc NT $\geq 4\text{mm}$ và nhóm 2 với nguy cơ từ 1/11 - 1/250 và NT $< 4\text{mm}$. Kết quả nghiên cứu phát hiện được tất cả các trường hợp trisomy 21, 18 hoặc 13, 80% các trường hợp SCAs, 62,5% bất thường NST khác và tránh được 82,5% thủ thuật xâm lấn ở thai phụ có bộ NST thai bình thường. Trên những thai phụ có nguy cơ cao thai kỳ 1, việc lựa chọn chính xác nhóm thai phụ cần thực hiện thủ thuật xâm lấn (nguy cơ $\geq 1/10$ và NT $\geq 4\text{mm}$) và nhóm thai phụ nên làm xét nghiệm NIPS có thể làm giảm đáng kể số lượng các thai phụ phải thực hiện thủ thuật xâm lấn, ngoài khả năng chẩn đoán chính xác trisomy còn chẩn đoán trên 60% trường hợp bất thường NST khác không thể phát hiện được bằng xét nghiệm NIPS [185]. Nghiên cứu lớn của Syngelaki và cộng sự năm 2014, Tỷ lệ mắc trisomies 21, 18 và 13, monosomy X, thể tam bội và các bất thường NST khác ở nhóm thai phụ có nguy cơ $\geq 1/10$ hoặc NT $\geq 3,5\text{mm}$ cao hơn đáng kể so với nhóm thai phụ có nguy cơ $< 1/10$ hoặc NT $< 3,5\text{mm}$. Nên chỉ

định thủ thuật xâm lấn trên nhóm thai phụ có nguy cơ $\geq 1/10$ hoặc NT $\geq 3,5\text{mm}$ nhờ đó có thể phát hiện bất thường các NST khác (ngoài NST 21, 18, 13), các bất thường NST khác có thể bị bỏ qua nếu xét nghiệm sàng lọc huyết thanh thai phụ được thay thế toàn bộ bằng xét nghiệm NIPS [186]. Hiệp hội siêu âm quốc tế về thai phụ khoa (ISUOG) đã đưa ra hướng dẫn về việc sử dụng xét nghiệm NIPS thích hợp và khuyến nghị xét nghiệm NIPS không nên thay thế thủ thuật xâm lấn ở thai phụ có xét nghiệm CFTS nguy cơ $\geq 1/10$. Do đó, không nên tư vấn xét nghiệm NIPS mà chỉ định thủ thuật xâm lấn (lấy mẫu gai rau hoặc hút dịch ối) thực hiện xét nghiệm karyotype cho tất cả thai phụ có xét nghiệm CFTS nguy cơ $\geq 1/10$ và NT $\geq 4\text{mm}$ [187].

Nghiên cứu của Benachi và cộng sự năm 2015 trên 900 thai phụ có nguy cơ lệch bội NST thai có hoặc không có siêu âm hình thái bất thường và đã được thực hiện thủ thuật xâm lấn. Xét nghiệm NIPS được thực hiện song song và so sánh kết quả. Kết quả xét nghiệm NIPS xác định 76/76 (100,0%) trisomy 21, 22/25 (88%) trisomy 18 và 12/12 (100,0%) trisomy 13. Ở những thai phụ có siêu âm bình thường và kết quả xét nghiệm NIPS âm tính, karyotype đã xác định được 02/483 (0,4%) các bất thường NST khác với trisomies 13, 18 và 21. Trên những thai phụ có siêu âm bất thường (hình thái bất thường và NT cao) và kết quả xét nghiệm NIPS âm tính, có 23/290 (7,9%) có bất thường NST khác ngoài trisomy 21, 18 và 13. Như vậy, trong trường hợp NT cao hoặc siêu âm bất thường hình thái, nên tư vấn chỉ định chẩn đoán xâm lấn cho thai phụ, để phát hiện trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13 hoặc các bất thường NST khác [188]. Mặc dù Hiệp hội Y học mẹ và thai (SMFM) khuyến cáo kết quả siêu âm thai bất thường là một chỉ định để xem xét việc sử dụng xét nghiệm NIPS, tuy nhiên thai phụ nên được tư vấn trước xét nghiệm rằng xét nghiệm NIPS sẽ bỏ sót khoảng 8% các bất thường NST khác mà thủ

thuật xâm lấn có thể phát hiện được qua xét nghiệm karyotype hoặc microarray [189]. Petersen và cộng sự năm 2014 báo cáo về tỷ lệ bất thường NST sẽ bị bỏ sót khi thai phụ thực hiện xét nghiệm NIPS, nghiên cứu trên 193.638 thai phụ được sàng lọc kết hợp thai kỳ 1, trong đó 10.205 (5,3%) thai phụ thực hiện thủ thuật xâm lấn làm xét nghiệm karyotype. Kết quả 1.122 thai phụ (11,0%) có bất thường NST, trong đó 262 thai phụ (23,4%) không phát hiện được bất thường NST không điển hình bởi xét nghiệm NIPS. Tỷ lệ bất thường NST không điển hình tăng lên ở thai phụ trên 45 tuổi, NT $\geq 3,5$ mm, hoặc bất thường huyết thanh mẹ như FBhCG $< 0,2$ hoặc ≥ 5 MoM hoặc PAPP-A $< 0,2$ MoM. Do vậy, với những yếu tố nguy cơ như tuổi thai phụ cao trên 45 tuổi, siêu âm bất thường hình thái bao gồm cả tăng NT, hoặc xét nghiệm huyết thanh thai phụ với nguy cơ $\geq 1/10$, cần xem xét kỹ để chỉ định thủ thuật xâm lấn thay vì tư vấn thai phụ làm xét nghiệm NIPS [189]. Báo cáo của Beulen và cộng sự năm 2017 nghiên cứu hiệu quả của xét nghiệm NIPS trên thai phụ có siêu âm bất thường cũng đưa ra kết luận xét nghiệm NIPS không nên chỉ định nhằm đánh giá bất thường NST trên những thai phụ có siêu âm bất thường, vì cả độ nhạy, hoặc giá trị tiên đoán âm đều thấp hơn so với xét nghiệm karyotype truyền thống và microarray. Tuy nhiên, một số thai phụ vẫn coi xét nghiệm NIPS là một lựa chọn thay thế cho thủ thuật xâm lấn [190].

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 95,21% 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.

Trong nghiên cứu, những thai phụ có kết quả xét nghiệm NIPS âm tính, kết quả xét nghiệm NIPS dương tính giả và âm tính giả (8 mẫu karyotype

bình thường và 1 mẫu 47,XYY), thai phụ có xét nghiệm NIPS thất bại (nguyên nhân do cffDNA thấp và giải trình tự thất bại) đều được theo dõi thai cho đến khi sinh, kiểm tra hồ sơ trẻ khi sinh, trẻ sơ sinh được bác sĩ chuyên khoa nhi khám ngay sau sinh, theo dõi tình trạng của trẻ bằng điện thoại cho sản phụ và gia đình sau sinh 1 tháng cho thấy các trường hợp đều sinh trẻ khỏe mạnh bình thường. Không phát hiện trường hợp nào âm tính giả với trisomy 21, 18 và 13. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu của Dan, Shan và cộng sự [6],[151]. Hầu hết SCAs không có triệu chứng lâm sàng rõ ràng hoặc bất thường trên siêu âm [176], do vậy, hạn chế của nghiên cứu là chỉ có thể khám trẻ sau sinh và điện thoại cho sản phụ xác định tình trạng của trẻ mà không thể chẩn đoán chính xác tất cả các trường hợp âm tính giả với SCAs.

Những kết quả nghiên cứu chỉ đóng góp một phần nhỏ trong bối cảnh ngày càng phát triển của xét nghiệm NIPS. Ngày càng có nhiều nghiên cứu về NIPS được cập nhật, với các nghiên cứu kiểm chứng hiện đang được công bố ở các nhóm thai phụ có nguy cơ thấp và trung bình, làm cho giá xét nghiệm ngày càng giảm và tiếp tục có nhiều bước tiến về khả năng của xét nghiệm NIPS [191]. Cỡ mẫu của nghiên cứu thấp có thể ảnh hưởng đến việc đánh giá hiệu quả của xét nghiệm NIPS.

Hầu hết các bất thường NST hiện nay vẫn còn là một thách thức lớn đối với nền Y học nước ta cũng như trên thế giới. Thai phụ mang thai bất thường NST thường sảy thai tự nhiên trong ba tháng đầu thai kỳ hoặc thai chết trước khi sinh, chỉ có 0,6% trẻ sinh sống. 3 - 4% trẻ sinh sống có liên quan đến đa dị tật bẩm sinh, chậm phát triển tâm thần hoặc rối loạn di truyền [16]. Phần lớn bệnh nhân tử vong, hoặc phải sống chung với dị tật bẩm sinh, để lại hậu quả nặng nề cho gia đình và xã hội. Hiện nay, nhờ sự tiến bộ của nền y học và đặc

biệt là sự phát triển không ngừng của ngành sinh học phân tử nói chung cũng như kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới, nhiều bất thường NST thai được sàng lọc, chẩn đoán sớm và có thể có phương pháp điều trị khả quan hơn. Tuy nhiên, trước khi có phương pháp điều trị đặc hiệu thì việc sàng lọc, chẩn đoán trước sinh và phòng bệnh bằng phương pháp đình chỉ thai nghén chủ động là phương pháp cơ bản hiện nay. Bởi vậy, tầm quan trọng của sàng lọc, chẩn đoán trước sinh ngày càng được khẳng định. Sự phát triển nhanh chóng của các chuyên ngành sản khoa, nhi khoa, chẩn đoán hình ảnh, hóa sinh, di truyền và sự phối hợp của các chuyên ngành này với sự phát triển của sinh học phân tử sẽ là động lực thúc đẩy những thành tựu trong sàng lọc, chẩn đoán trước sinh bất thường NST thai, nhằm hạn chế dị tật bẩm sinh trong cộng đồng đặc biệt là trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13 và một số lệch bội NST giới tính. Do vậy, việc áp dụng xét nghiệm NIPS trong sàng lọc trước sinh là điều vô cùng cần thiết, giúp tăng tỷ lệ phát hiện và giảm tỷ lệ dương tính giả phát hiện lệch bội NST thường gặp, nhờ đó làm giảm đáng kể tỷ lệ mất thai do thủ thuật xâm lấn không cần thiết.

KẾT LUẬN

Căn cứ trên 2 mục tiêu của nghiên cứu, bằng việc áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới phân tích DNA thai tự do trong huyết tương thai phụ phát hiện lệch bội NST 21, 18, 13 và lệch bội NST giới tính, kết quả nghiên cứu thu được cho phép rút ra một số kết luận như sau:

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 thai phụ.

- Tỷ lệ xét nghiệm NIPS thất bại là 1,44%, trong đó nguyên nhân do nồng độ cffDNA 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 và hoàn thiện được quy trình giải trình tự gen phát hiện lệch bội NST thai: DNA thư viện 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 kết quả xét nghiệm NIPS dương tính bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới phân tích cffDNA 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 thai phụ.

- 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%.

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

- Lệch bội 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,XYY); 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%, hội chứng Klinefelter (47,XXY) là 66,7% và cao nhất là hội chứng trisomy X (47,XXX) là 100%. Độ nhạy và giá trị tiên đoán dương cho phát hiện 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

Từ những kết quả thu được, nhóm nghiên cứu đưa ra một số kiến nghị sau:

- 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, kết quả sàng lọc trước sinh truyền thống và siêu âm hình thái: 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 huyết thanh mẹ 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, tư vấn thai phụ thực hiện 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 cho thai phụ về ưu điểm cũng như hạn chế của xét nghiệm NIPS phát hiện lệch bội NST, đặc biệt là hội chứng Patau và các hội chứng lệch bội NST giới tính để tránh gây sang chấn về tâm lý cho thai phụ khi nhận được kết quả xét nghiệm NIPS dương tính, đặc biệt với hội chứng Patau và lệch bội NST giới tính.

NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu này đã có một số đóng góp mới sau:

1. 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.

2. 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.

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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2008). Update on overall prevalence of major birth defects-Atlanta, Georgia, 1978-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 57(1), 1- 5.
2. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF et al (2007). Thompson & Thompson genetics in medicine. *7th edition*, Philadelphia: Saunders/ Elsevier.
3. Diana Wellesley et al (2012). Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *European Journal of Human Genetics*, 20, 521-526.
4. Nicolaides KH (2003). Screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 21, 313-321.
5. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F (2015). Procedure-related risk of miSCArriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45, 16-26.
6. Shan Dan, Wei Wang et al (2012). Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11.105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenatal Diagnosis*, 32(13), 1225-32.
7. Gil MM, Quezada MS, Revello R et al (2015). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45, 249-66.

8. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR (2008). Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 16266-71.
9. Chiu RW, Chan, KC, Gao Y, et al (2008). Noninvasive Prenatal Diagnosis of Fetal Chromosomal Aneuploidy by Massively Parallel Genomic Sequencing of DNA in Maternal Plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105, 20458-20463.
10. Driscoll DA, Gross S (2009). Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy. *N Engl J Med*, 360(24), 2556-62.
11. Nielsen J, Wohler M (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet*, 87(1), 81-3.
12. Zhang YP, Wu JP, Li XT, et al. (2011). [Karyotype analysis of amniotic fluid cells and comparison of chromosomal abnormality rate during second trimester]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 46(9), 644-8.
13. Phùng Như Toàn (2003). Khảo sát karyotype thai nhi qua nuôi cấy tế bào ối trong chẩn đoán tiền sản. *Nội san Thai phụ khoa, số đặc biệt*, 278-282.
14. Hoàng Thị Ngọc Lan, Nguyễn Việt Hùng, Trịnh Văn Bảo, Trần Thị Thanh Hương (2004). Chẩn đoán xác định một số dị tật thai nhi bằng phân tích nhiễm sắc thể tế bào ối nuôi cấy. *Tạp trí nghiên cứu y học*, 28(2), 5-12.
15. Trần Danh Cường (2005). Một số nhận xét về kết quả chọc hút nước ối trong chẩn đoán trước sinh tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương. *Nội san Thai phụ khoa, số đặc biệt*, 348-356.
16. Duarte AC, Cunha E, Roth JM (2004). Cytogenetics of genetic counseling patients in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. *Genet Mol Res*, 3(3), 303-308.

17. Robert LN, Roderick RM, Huntington FW (2007). *Thompson & Thompson Genetics in medicine. Seventh Edition.*
18. Cereda A, Carey JC (2012). The trisomy 18 syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 7, 81.
19. Goel N, Morris JK, Tucker D et al (2019). Trisomy 13 and 18- Prevalence and mortality-A multi-registry population based analysis. *Am. J. Med. Genet. A*, 179, 2382-92.
20. Han SH, An JW, Jeong GY et al (2008). Clinical and cytogenetic findings on 31.615 mid-trimester amniocenteses. *Korean JLab Med*, 28(5), 378-85.
21. Ducarme G, Graesslin O, Alanio E et al (2005). Hyperclarté nucale et hygroma cervical au premier trimestre de la grossesse. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 33(10), 750-754.
22. Otano L, Aiello H, Igarzabal L et al (2002). Association between first trimester absence of fetal nasal bone on ultrasound and Down's syndrome. *Prenat Diagn*, 22, 930-932.
23. Wright D, Syngelaki A, Bradbury I, Akolekar R, Nicolaides KH (2014). First-trimester screening for trisomies 21, 18 and 13 by ultrasound and biochemical testing. *Fetal Diagn Ther*, 35(2), 118-26.
24. Practice Bulletin (2016). Screening for fetal aneuploidy, *Clinical management guidelines for Obstetrician and Gynecologists*, 163.
25. Shaffer LG, Bejjani BA (2006). Medical applications of array-CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogen Genome Res*, 115, 303-309.
26. Ward B.E, Gersen S.L, Carelli M.P et al (1993). Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4.500 specimens. *Am J Hum Genet*, 52, 854-865.
27. Mansfield E.S (1993). Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet*, 2, 43-50.

28. Kim S, Nam S, Lee S et al (2005). ArrayCyGHt: a web application for analysis and visualization of array-CGH data. *Bioinformatics*, 21, 2554-55.
29. Grati FR, Molina Gomes D et al (2015). Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenat Diagn*, 35, 801-9.
30. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM (1969). Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet*, 1(7606), 1119-22.
31. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF et al (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350, 485-7.
32. Lun FM, Chiu RW, Chan KC et al (2008). Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 54(10), 1664-72.
33. Webb SJ, Harrison DJ, Wyllie AH (1997). Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv Pharmacol*, 41, 1-34
34. Jahr S, Hentze H, Englisch S et al (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 61, 1659-65.
35. Hahn S, Huppertz B, Holzgreve W (2005). Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation? *Placenta*.
36. Wright CF, Burton H (2009). The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update*, 15(1), 139-151.
37. Suzumori N, Ebara T, Yamada T et al (2016). Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy. *J Hum Genet*, 61, 647-52.

38. Papantoniou N, Bagiokos V, Agiannitopoulos K et al (2013). RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia. *Prenat Diagn*, 33 (7), 682-687.
39. Chan KC, Zhang J, Hui AB et al (2004). Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 50, 88-92.
40. Lo YM, Zhang J, Leung TN et al (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*, 64, 218-24.
41. EmLen W, Burdick G (1998). Clearance and organ localization of small DNA anti-DNA immune complexes in mice. *J Immunol*, 140, 1816-22.
42. Savill J (1998). Apoptosis. Phagocytic docking without shocking. *Nature*, 392, 442-3.
43. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC et al (2013). Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 41(1), 26-32.
44. Chan RWY, Jiang P, Peng Z et al (2015). Plasma DNA aberrations in systemic lupus erythematosus revealed by genomic and methylomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci*, 111, E5302-11.
45. Zhou Y, Zhu Z, Gao Y et al (2015). Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma. *Reproductive Sciences*, 22(11), 1429-35.
46. Kim SK, Hannum G, Geis J et al (2015). Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat. Diagn*, 35, 810-815.
47. Jorgez, C. J. & Bischof, F. Z (2009). Improving enrichment of circulating fetal DNA for genetic testing: size fractionation followed by whole gene amplification. *Fetal diagnosis and therapy*, 25, 314-319.
48. Norton ME, Brar H, Weiss J et al (2012). Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol*, 207, 137. e1-137.e8.

49. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM et al (2013). The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn*, 33(7), 667-74.
50. Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM et al (2012). DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med*, 14(3), 296-305.
51. Hudecova I, Sahota D, Heung MM et al (2014). Maternal plasma fetal DNA fractions in pregnancies with low and high risks for fetal chromosomal aneuploidies. *PLoS ONE*, 9, e88484.
52. Jiang P, Peng X, Su X et al (2016). FetalQuantSD: Accurate quantification of fetal DNA fraction by shallow-depth sequencing of maternal plasma DNA. *NPJ Genom. Med*, 1, 16013.
53. Nygren AO, Dean J, Jensen TJ et al. (2010). Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. *Clin. Chem*, 56, 1627-1635.
54. Hill M, Finning K, Martin P et al (2011). Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clinical Genetics*, 80, 68.
55. Daniels G, Finning K, Martin P et al. (2009). Non-invasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenatal Diagnosis*, 29, 101.
56. Bianchi DW (2004). Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential - a review. *Placenta*, 25 Suppl A, 93-101.
57. Al Nakib M, Desbriere R, Bonello N et al (2009), Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction. *Fetal Diagn Ther*, 26, 24-28.
58. Farina A, LeShane ES, Romero R et al (2005). High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 193, 421- 425.

59. Vora NL, Johnson KL, Basu S et al (2012). A multifactorial relationship exists between total circulating cell-free DNA levels and maternal BMI. *Prenat Diagn*, 32, 912-914.
60. Wataganara T, Chen AY, LeShane ES et al (2004). Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril*, 81, 638-644.
61. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J et al. (2014). DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *New England Journal of Medicine*, 370, 799-808.
62. Mardis ER (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9, 387-402.
63. Vermeesch RJ, Voet T, Devriendt K (2016). Prenatal and pre-implantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet*, 17(10), 643-56.
64. Nicolaidis KH, Syngelaki A, Gil M et al (2013). Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn*, 33, 575-579.
65. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 545: Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2012, 120, 1532-34.
66. American College of Obstetricians and Gynecologist Committee on Genetics. Committee Opinion No.640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2015, 126, e31-e37.
67. Benn P, Borrell A, Chiu RW et al (2015). Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn*, 35, 725-734.
68. M.M. Gil, V. Accurti, B. Santacruz et al (2017). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 50, 302-314.

69. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK et al (2015). Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med*, 23(372), 1589-97.
70. Song Y, Liu C, Qi H et al (2013). Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat Diagn*, 33, 700-706.
71. American College of Obstetricians and Gynecologist. Screening for fetal aneuploidy. ACOG practice bulletin no.162. *Obstet Gynecol*. 2016; 127, 979-81
72. Sian Taylor-Phillips, Karoline Freeman, Julia Geppert et al (2016). Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 6.
73. Grati FR, Malvestiti F, Ferreira JCPB et al (2014). Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genet Med*, 16, 620-4.
74. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A et al (2015). Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *Am J Obstet Gynecol*, 212, 79.e1-79.e9.
75. Futch T, Spinoso J, Bhatt S et al (2013). Initial clinical laboratory experience in noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy from maternal plasma DNA samples. *Prenat Diagn*, 33, 569-574.
76. Wang Y, Chen Y, Tian F et al (2014). Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clin Chem*, 60, 251-259.
77. Wang S, Huang S, Ma L et al (2015). Maternal X chromosome copy number variations are associated with discordant fetal sex chromosome aneuploidies detected by noninvasive prenatal testing. *Clin Chim Acta*, 444, 113-6.

78. Snyder MW, Simmons LE, Kitzman JO et al (2015). Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. *N Engl J Med*, 372, 1639-45.
79. Osborne CM, Hardisty E, Devers P et al (2013). Discordant noninvasive prenatal testing results in a patient subsequently diagnosed with metastatic disease. *Prenat Diagn*, 33, 609-611.
80. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ et al (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, 6(224), 224ra24.
81. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ et al (2015). Noninvasive prenatal testing and incidental detection of occult maternal malignancies. *JAMA*, 314, 162-169.
82. Mark D. Pertile (2018). Genome-Wide Cell-Free DNA-Based Prenatal Testing for Rare Autosomal Trisomies and Subchromosomal Abnormalities. *Noninvasive Prenatal Testing (NIPT)*, Chapter 7, 97-123.
83. Song K, Musci TJ, Caughey AB (2013). Clinical utility and cost of non-invasive prenatal testing with DNA tır do analysis in high-risk women based on a US population. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 26, 1180-1185.
84. Larion S, Warsof SL, Romary L et al (2014). Association of combined first-trimester screen and noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. *Obstet Gynecol*, 123, 1303-1310.
85. Kostenko E, Chantraine F, Vandeweyer K et al (2019). Clinical and Economic Impact of Adopting Noninvasive Prenatal Testing as a Primary Screening Method for Fetal Aneuploidies in the General Pregnancy Population. *Fetal Diagn Ther*, 45(6), 413-423.
86. Warsof SL, Larion S, Abuhamad AZ (2015). Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. *Prenat Diagn*, 35, 972-979.

87. Nguyễn Thanh Thúy, Ngô Thị Thúy, Vũ Triệu An và cộng sự (2010). Sử dụng kỹ thuật PCR lồng phát hiện DNA phôi thai từ huyết thanh mẹ và ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh. *Tạp chí Thông tin Y Dược*, 3891, 41-45.
88. Trịnh Tiến Sang và cộng sự (2013). Phát hiện DNA tự do của thai trong huyết tương phụ nữ mang thai bằng kỹ thuật PCR, ứng dụng chẩn đoán bệnh di truyền trước sinh. *Tạp chí y học Việt Nam*.
89. Nguyễn Thị Phương Lan và cộng sự (2019). Nghiên cứu DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật Realtime PCR nhằm dự báo sớm tiền sản giật. *Luận án Tiến sĩ*, Đại học Y Hà Nội.
90. Wong D, Moturi S, Angkachatchai V et al (2013). Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem*, 46(12), 1099-1104.
91. Yu B, Lu By, Zhang B et al (2017). Overall evaluation of the clinical value of prenatal screening for fetal-free DNA in maternal blood. *Medicine (Baltimore)*, 96(27), e7114.
92. Zhang B, Lu By, Yu B et al (2017). Noninvasive prenatal screening for fetal common sex chromosome aneuploidies from maternal blood. *J Int Med Res*, 45(2), 621-630.
93. McCullough RM, Almasri EA, Guan X et al (2014). Non-Invasive Prenatal Chromosomal Aneuploidy Testing-Clinical Experience: 100.000 Clinical Samples. *PLoS One*, 9(10), e109173.
94. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 88, 2007. Invasive prenatal testing for aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 110(6), 1459-1467.
95. Rosen Dj, Kedar I, Amiel A et al (2002). A negative second trimester triple test and absence of specific ultrasonographic markers may decrease the need for genetic amniocentesis in advanced maternal age by 60%. *Prenat Diagn*, 22(1), 59-63.

96. Ying Xue¹, Guodong Zhao, Hong Li et al (2019), Non-invasive prenatal testing to detect chromosome aneuploidies in 57,204 pregnancies. *Molecular Cytogenetics*, 12, 29.
97. Hidestrand M, Stokowski R, Song K et al (2012). Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther*, 31(2), 122-128.
98. Noninvasive Prenatal Testing (NIPT). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814189-2.00001-3>, Chapter 2, 9-10.
99. D W Bianchi, G K Zickwolf, G J Weil, S Sylvester, M A DeMaria (1996). Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(2), 705-708.
100. Jeon YJ, Zhou Y, Li Y et al (2014). The Feasibility Study of Non-Invasive Fetal Trisomy 18 and 21 Detection with Semiconductor Sequencing Platform. *PLoS One*, 9(10), e110240.
101. Houfflin-Debarge V, O'Donnell H, Overton T et al (2000). High sensitivity of fetal DNA in plasma compared to serum and nucleated cells using unnested PCR in maternal blood. *Fetal Diagn Ther*, 15(2), 102-107.
102. Y.M. Lo, K. C. Chan, H. Sun et al (2010). Maternal Plasma DNA Sequencing Reveals the Genome-Wide Genetic and Mutational Profile of the Fetus. *Science Translational Medicine*, 2(61), 61-91.
103. Liao C, Yin AH, Peng CF et al (2014). Noninvasive prenatal diagnosis of common aneuploidies by semiconductor sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(20), 7415-20.
104. Caboche S, Audebert C, Lemoine Y, Hot D (2014). Comparison of mapping algorithms used in high-throughput sequencing: Application to Ion Torrent data. *BMC Genomics*, 15(264).

105. Taneja PA, Snyder HL, De Feo E, et al (2016). Noninvasive prenatal testing in the general obstetric population: clinical performance and counseling considerations in over 85.000 cases. *Prenat Diagn*, 36, 237-43.
106. Yaron Y (2016). The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon. *Prenat Diagn*, 36, 391-396.
107. Yared E, Dinsmoor MJ, Endres LK et al (2016). Obesity increases the risk of failure of noninvasive prenatal screening regardless of gestational age. *Am J Obstet Gynecol*, 215(3), 370.e1-6.
108. Eric Wang, Annette Batey, Craig Struble et al (2013). Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*, 33, 662-666.
109. Pergament E, Cuckle H, Zimmermann B et al (2014). Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. *Obstet Gynecol*, 124, 210-8.
110. Sims D, Sudbery I, Illott NE et al (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet*, 15(2), 121-132.
111. Gómez-Manjón I, Moreno-Izquierdo A, Mayo S et al (2018). Noninvasive Prenatal Testing: Comparison of Two Mappers and Influence in the Diagnostic Yield. *BioMed Research International*, 1-6.
112. Fairbrother G, Johnson S, Musci T.J, Song K (2013). Clinical Experience of Noninvasive Prenatal Testing with Cell-Free DNA for Fetal Trisomies 21, 18, and 13 in a General Screening Population. *Prenatal Diagnosis*, 33, 580-583.
113. Jiang F, Ren J, Chen F et al (2012). Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) Test: An Advanced Noninvasive Prenatal Diagnosis Methodology for Fetal Autosomal and Sex Chromosomal Aneuploidies. *BMC Medical Genomics*, 5, 57.

114. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M et al (2012). Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol*, 206, 322.e1-5.
115. Kim S, Jung H, Han SH et al (2016). An Adaptive Detection Method for Fetal Chromosomal Aneuploidy Using Cell-Free DNA from 447 Korean Women. *BMC Medical Genomics*, 9, 61.
116. Lau T.K, Cheung S.W, Lo P.S et al (2014). Non-Invasive Prenatal Testing for Fetal Chromosomal Abnormalities by Low-Coverage Whole-Genome Sequencing of Maternal Plasma DNA: Review of 1982 Consecutive Cases in a Single Center. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 43, 254-264.
117. Hyuk Jung Kwon, Amit Goyal, Heesu Im et al (2017). Multiple z-Score Based Method for Noninvasive Prenatal Test Using Cell-Free DNA in Maternal Plasma. *Open Journal of Genetics*, 7, 1-8.
118. Susannah Maxwell, Jan E. Dickinson, Ashleigh Murdoch, Peter O'leary (2015). The potential impact of NIPT as a second-tier screen on the outcomes of high-risk pregnancies with rare chromosomal abnormalities. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 55, 420-42.
119. Chiu RW, Lo YM (2011). Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Semin Fetal Neonatal Med*, 16(2), 88-93.
120. Liang, B. et al (2018). Enrichment of the fetal fraction in non-invasive prenatal screening reduces maternal background interference. *Sci Rep*, 8, 17675.
121. XiaoleiXie, Fuguang Li, WeiheTan et al (2019). The Effect of Freezing on Noninvasive Prenatal Testing. *Scientific Reports*, 9, 6962.

122. Scott FP, Menezes M, Palma-Dias R et al (2018). Factors affecting cell-free DNA fetal fraction and the consequences for test accuracy. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 31(14), 1865-72.
123. Wright D, Wright A, Nicolaides KH et al (2015). A unified approach to risk assessment for fetal aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45(1), 48-54.
124. Dar P, Curnow KJ, Gross SJ et al (2014). Clinical experience and follow-up with large SCAle single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *Am J Obstet Gynecol*, 211, 527.e1-17.
125. Kinnings SL, Geis JA, Almasri E et al (2015). Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn*, 35, 816-822.
126. Matthew S. Hestand, Mark Bessem, Peter van Rijn et al (2018). Fetal fraction evaluation in non-invasive prenatal screening (NIPS). *European Journal of Human Genetics*.
127. Brar H, Wang E, Struble C et al (2013). The fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma is not affected by a priori risk of fetal trisomy. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 26(2), 143-145.
128. Y. Song, S. Huang, X. Zhou et al (2015). Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidies in the first trimester of pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45, 55-60.
129. Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW (2014). Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem*, 60, 243-50.
130. Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, Mosimann B, Nicolaides KH (2012). Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors. *Fetal Diagn Ther*, 31, 237-243.

131. Revello R, Sarno L, Ispas A et al (2016). Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 47, 698-704.
132. Haghiac M, Vora NL, Basu S et al (2012). Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women. *Obesity (Silver Spring)*, 20(11), 2213-9.
133. Wang E, Batey A, Struble C et al (2013). Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*, 33(7), 662- 6.
134. Hou Y, Yang J, Qi Y et al (2019). Factors affecting cell-free DNA fetal fraction: statistical analysis of 13,661 maternal plasmas for non-invasive prenatal screening. *Hum Genomics*, 13(1), 62.
135. Grace MR, Hardisty E, Dotters-Katz SK et al (2016). Cell-free DNA screening: complexities and challenges of clinical implementation. *Obstet Gynecol Surv*, 71, 477-87.
136. Kruckow S., Schelde P., Hatt L et al (2019). Does Maternal Body Mass Index Affect the Quantity of Circulating Fetal Cells Available to Use for Cell-Based Noninvasive Prenatal Test in High-Risk Pregnancies ?. *Fetal Diagn Ther*, 45, 353-356.
137. Hui L (2016). Noninvasive prenatal testing for aneuploidy using cell-free DNA-New implications for maternal health. *Obstet Med*, 9, 148-52.
138. Benn P, Cuckle H (2014). Theoretical performance of non-invasive prenatal testing for chromosome imbalances using counting of cell-free DNA fragments in maternal plasma. *Prenat Diagn*, 34, 778-783.
139. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM et al (2015). Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative? *Prenat Diagn*, 35, 289-293.
140. Wright A, Zhou Y, Weier JF et al (2004). Trisomy 21 is associated with variable defects in cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Med Genet*, 130A, 354-64.

141. Lo YM, Lau TK, Zhang J et al (1999). Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem*, 45, 1747-1751.
142. Bianchi DW, Wilkins-Haug L (2014). Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: What has happened since the rubber met the road ?. *Clin. Chem*, 60, 78-87.
143. Xu-PingXu, Hai-YanGan, Fen-XiaLi et al (2016). A Method to Quantify Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma Using Next Generation Sequencing: Its Application in Non-Invasive Prenatal Chromosomal Aneuploidy Detection. *Plos one*, 11(1), e0146997.
144. Annelies Dheedene, Tom Sante, Matthias De Smet et al (2016). Implementation of non-invasive prenatal testing by semiconductor sequencing in a genetic laboratory. *Prenatal Diagnosis*, 36, 699-707.
145. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN et al (2016). NIPTRIC: an online tool for clinical interpretation of non-invasive prenatal testing (NIPT) results. *Sci Rep*, 6(38359).
146. Gardner RJ, Sutherland GR, Shaffer LG (2012). Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 4th edn. Oxford University Press: New York.
147. Đặng Ngọc Khánh (2010). Một số bất thường di truyền gây sảy thai liên tiếp”. *Tạp chí sinh sản và sức khỏe*, Bệnh viện Từ Dũ.
148. P. Benn, H. Cuckle, E. Pergament (2013). Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 42, 15-33
149. Dickens BM (2014). Ethical and legal aspects of noninvasive prenatal genetic diagnosis. *Int J Gynaecol Obstet*, 124(2), 181-4.
150. H. Choi , T.K. Lau , F.M. Jiang et al (2013). Fetal aneuploidy screening by maternal plasma DNA sequencing: “False positive” due to confined placental mosaicism. *Prenat Diagn*, 33, 198-200.

151. Zhang H, Gao Y, Jiang F et al (2015). Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146,958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45(5), 530-8.
152. Hua Hu, Li Wang, Jiayan Wu et al (2019). Noninvasive prenatal testing for chromosome aneuploidies and subchromosomal microdeletions/microduplications in a cohort of 8141 single pregnancies. *Human Genomics*, 13(1), 14.
153. Yuan Tian, Linlin Zhang, Weifang Tian et al (2018). Analysis of the accuracy of Z-scores of noninvasive prenatal testing for fetal Trisomies 13, 18, and 21 that employs the Ion Torrent semiconductor sequencing platform. *Molecular Cytogenetics*, 11, 49.
154. Jensen TJ, Zwiefelhofer T, Tim RC et al (2013). High-throughput massively parallel sequencing for fetal aneuploidy detection from maternal plasma. *PLoS One*, 8, e57381.
155. Li Ma, Ri-Ming Liu, Li-Na Chu et al (2018). Non-invasive prenatal testing assisted in detecting fetus sex chromosome aneuploidy: a retrospective study of 6,002 singleton pregnancy women cohort. *Int J Clin Exp Med*, 11(11), 12643-12649.
156. Sebire NJ, Snijders RJ, Brown R, Southall T, Nicolaides KH (1998). Detection of sex chromosome abnormalities by nuchal translucency screening at 10-14 weeks. *Prenat Diagn*, 18, 581-584.
157. Reiss RE, Discenza M, Foster J, Dobson L, Wilkins-Haug L (2017). Sex chromosome aneuploidy detection by noninvasive prenatal testing: helpful or hazardous ? *Prenat Diagn*, 37, 515-520.
158. Yao H, Zhang L, Zhang H et al (2012). Noninvasive prenatal genetic testing for fetal aneuploidy detects maternal trisomy X. *Prenat Diagn*, 32, 1114-1116.

159. Russell LM, Strike P, Browne CE, Jacobs PA (2007). X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res*, 116, 181-5.
160. Hook EB (1977). Exclusion of Chromosomal Mosaicism: Tables of 90%, 95% and 99% Confidence Limits and Comments on Use. *Am J Hum Genet*, 29, 94-97.
161. Fleischer J, Shenoy A, Goetzinger K., et al (2015). Digynic triploidy: utility and challenges of noninvasive prenatal testing. *Clinical Case Reports*, 3(6), 406-10.
162. Francesco Crea, Matthew Forman, Rachel Hulme et al (2017). The IONA® test: development of an automated cell-free DNA-based screening test for fetal trisomies 13, 18, and 21 that employs the Ion Torrent semiconductor sequencing platform. *Fetal Diagn Ther*, 42(3), 218-24.
163. Zhou Q, Pan L, Chen S et al (2014). Clinical application of noninvasive prenatal testing for the detection of trisomies 21, 18, and 13: a hospital experience. *Prenat Diagn*, 34(11), 1061-5.
164. Iwarsson E, Jacobsson B, Dagerhamn J, et al (2017). Analysis of cell-free fetal DNA in maternal blood for detection of trisomy 21, 18 and 13 in a general pregnant population and in a high risk population a systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol SCand*, 96(1), 7-18.
165. Sekelska, Izsakova, Kubosova, et al (2019). Result of Prospective Validation of the Trisomy Test® for the Detection of Chromosomal Trisomies. *Diagnostics*, 9(4), 138.
166. Petersen AK1, Cheung SW2, Smith JL et al (2017). Positive predictive value estimates for cell-free noninvasive prenatal screening from data of a large referral genetic diagnostic laboratory. *Am J Obstet Gynecol*, 217(6), 691.e1-691.e6.
167. Hooks J, Wolfberg AJ, Wang ET et al (2014). Non-invasive risk assessment of fetal sex chromosome aneuploidy through directed analysis and incorporation of fetal fraction. *J. Prenatal Diagnosis*, 34(5), 496-499.

168. Porreco RP, Garite TJ, Maurel K et al (2014). Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *J. American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 211(4), 365, e1-12.
169. Xue Y, Li H, Zhang Q, Zhao G et al (2018). Noninvasive Prenatal Screening for Fetal Sex Chromosome Aneuploidies at Two Next-Generation Sequencing Platforms. *J. Annals of Clinical & Laboratory Science*, 48(4), 501-505.
170. Yao H, Jiang F, Hu H et al (2014). Detection of fetal sex chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: initial experience in a Chinese hospital. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 44, 17-24.
171. Cheung SW, Patel A, Leung TY (2015). Accurate description of DNA-based noninvasive prenatal screening. *N Engl J Med*, 372(17), 1675-77.
172. Yunyun Zheng, Shanning Wan, Yinghui Dang (2019). Non-invasive prenatal testing for detection of trisomy 13, 18, 21 and sex chromosome aneuploidies in 8.594 cases. *Ginekologia Polska*, 90(5), 270-273.
173. Deng C, Zhu Q, Liu S et al (2019). Clinical application of noninvasive prenatal screening for sex chromosome aneuploidies in 50.301 pregnancies: initial experience in a Chinese hospital. *Sci Rep*, 9(1), 7767.
174. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW et al (2011). Noninvasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large SCAle validity study. *BMJ*, 342, c7401.
175. Pan X, Zhang C, Li X et al (2014). Non-invasive fetal sex determination by maternal plasma sequencing and application in X-linked disorder counseling. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 27(18), 1829-33.
176. S. Wang, S. Huang, L. Ma et al (2015). Maternal X chromosome copy number variations are associated with discordant fetal sex chromosome aneuploidies detected by noninvasive prenatal testing. *Clin. Chim. Acta*, 444, 113-116.

177. Morris JK, Alberman E, Scott C, Jacobs P (2007). Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing?. *Eur J Hum Genet*, 16, 163-70.
178. AminR.Mazloom, Zeljko Dzakula, Paul Oeth et al (2013). Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Prenatal Diagnosis*, 33, 591-597.
179. Warren MP, Chua A (2006). Appropriate use of estrogen replacement therapy in adolescents and young adults with turner syndrome and hypopituitarism in light of the Women's health initiative. *Growth Horm IGF Res*, 16, 98-102.
180. Hong Yao, Lei Zhang, Hongyun Zhang et al (2012). Noninvasive prenatal genetic testing for fetal aneuploidy detects maternal trisomy X. *Prenatal Diagnosis*, 32, 1-3.
181. Abramsky L, Hall S, Levitan J et al (2001). What parents are told after prenatal diagnosis of a sex chromosome abnormality: interview and questionnaire study. *BMJ*, 322(7284), 463-6.
182. Committee on Practice Bulletins-Obstetrics, Committee on Genetics, and the Society for Maternal-Fetal Medicine. Practice Bulletin No. 163, Screening for Fetal Aneuploidy. *J. Obstetrics & Gynecology*. 127 (2016)
183. Gregg AR et al (2016). Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *J. Genetics in Medicine*, 18(10), 1056-1065.
184. Lyn S. Chitty, Louanne Hudgins, Mary E. Norton (2018). Current controversies in prenatal diagnosis 2: Cell-free DNA prenatal screening should be used to identify all chromosome abnormalities. *Prenatal Diagnosis*, 38, 160-165.
185. Nicola Persico, Simona Boito, Benedetta Ischia et al (2016). Cell-free DNA testing in the maternal blood in high-risk pregnancies after first-trimester combined screening. *Prenatal Diagnosis*, 36, 232-236.

186. Syngelaki A, Pergament E, Homfray T et al (2014). Replacing the combined test by cell-free DNA testing in screening for trisomies 21, 18 and 13: impact on the diagnosis of other chromosomal abnormalities. *Fetal Diagn Ther*, 35, 174-84.
187. Salomon LJ, Alfirevic Z, Audibert F et al (2014). ISUOG consensus statement on the impact of non-invasive prenatal testing (NIPT) on prenatal ultrasound practice. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 44, 122-123.
188. A.Benachi, A.Letourneau, P.Kleinfinger et al (2015). Cell-Free DNA Analysis in Maternal Plasma in Cases of Fetal Abnormalities Detected on Ultrasound Examination. *Obstet Gynecol*, 125(6), 1330-7.
189. Petersen OB, Vogel I, Ekelund C et al (2014). Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: population-based study from a country with existing first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 43, 265-271.
190. L. Beulen, B. H. W Fass, I. Feenstra et al (2017). Clinical utility of non-invasive prenatal testing in pregnancies with ultrasound anomalies. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 49, 721-728.
191. Nicolaides KH, Syngelaki A, del Mar Gil M et al (2014). Prenatal detection of fetal triploidy from cell-free DNA testing in maternal blood. *Fetal Diagn Ther*, 35, 212-7.

Phụ lục 1

KỸ THUẬT LẤY MẪU

Thực hiện theo hướng dẫn 05 (PL.04.STKH), Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

Vật tư tiêu hao:

- Ống Cell-Free DNA BCT (Streck BCTs) chứa chất bảo quản K3EDTA.
- Kim số 18 (kim lấy thuốc)
- Bơm tiêm 10mL

Thực hiện:

- Lấy 10mL máu toàn phần vào ống Streck BCTs, lắc trộn đều máu trong ống 8 - 10 lần sau khi lấy máu.
- Mẫu máu sau khi lấy để ở nhiệt độ phòng (mẫu máu sử dụng phân tích DNA tự do ổn định trong 14 ngày khi được bảo quản từ 6° - 37°C).

Phụ lục 2

GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI

Thực hiện theo QTKT-TS.NIPS-01, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

2.1. Tách huyết tương

- Ly tâm 1.600 vòng/phút/4°C/10 phút. Sau đó hút lớp huyết tương.
- Ly tâm tiếp lần 2 với tốc độ 16.000rpm/10 phút/4°C. Hút dịch nổi vào 3 ống eppendorf 1,5mL, mỗi ống chứa 1mL huyết tương. Lưu mẫu ở -80°C.

2.2. Tách DNA tự do (DNA tự do)

DNA tự do tổng số được tách thông qua hệ thống máy tách chiết tự động Prepito-D, sử dụng kit Free circulating NA từ Chemagen/Perkin Elmer. Quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Đo nồng độ DNA tự do sau tách

DNA tự do sau tách được đo nồng độ bằng máy quang phổ Qubit 3.0 sử dụng bộ kit Qubit dsDNA HS, thực hiện như sau:

- Pha hóa chất Qubit dsDNA HS/ buffer theo tỉ lệ 1:200
- Chuẩn bị dung dịch mẫu (2 μ L mẫu + 198 μ L Qubit đã pha) và dung dịch chuẩn (10 uL chuẩn + 190 μ L Qubit đã pha) vào 2 ống Qubit/mẫu, vortex.
- Ủ các ống xét nghiệm tại nhiệt độ phòng/2 phút (tránh ánh sáng trực tiếp)
- Chuẩn máy đo Qubit bằng 2 ống dung dịch chuẩn, đo nồng độ DNA tự do của từng ống mẫu.
- Bảo quản DNA tự do đã tách tại -80°C.

2.4. Quy trình tạo thư viện

2.4.1. Sửa đuôi và tinh sạch DNA tự do

- Sử dụng kit Ion Plus Fragment Library để sửa đuôi DNA tự do, chuẩn bị hỗn hợp sau cho mỗi mẫu:

Thành phần	Thể tích
DNA mẫu sau khi tách chiết	8,5 μ L
5 \times End-Repair Buffer	10 μ L
End Repair Enzymes	0,5 μ L
Nuclease-free water	31 μ L
Tổng	50 μ L

- Ủ phản ứng trong 30 phút tại nhiệt độ phòng

- Tinh sạch DNA tự do đã sửa với 90 μ L AMPure XP/mẫu.

2.4.2. Nối các đoạn adapters và tinh sạch DNA tự do

- Chuẩn bị hỗn hợp Ion P1 Adapter và Ion Xpress Barcode với tỉ lệ pha loãng 1:8 với nước Nuclease-Free.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng với các thư viện được gắn đầu mã vạch sử dụng dung dịch đã được pha loãng:

Thành phần	Thể tích
DNA tự do	20 μ L
Ion P1 Adapters	0,25 μ L
Ion Xpress Barcode X	0,25 μ L
10 x Ligase Buffer	5 μ L
DNA ligase	1 μ L
Nước nuclease-free	23,5 μ L
Tổng	50 μ L

- PCR với chu trình nhiệt 25 $^{\circ}$ C/15 phút, và giữ ở 4 $^{\circ}$ C

- Tinh sạch DNA tự do đã được nối adapters sử dụng 90 μ L AMPure/mẫu.

2.4.3. Nhân bản và tinh sạch DNA thư viện tự do

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng với DNA thư viện tự do như sau:

Thành phần	Thể tích
Platinum HiFi	48 μ L
Library Amplification Primers	2,5 μ L
DNA tự do	9,5 μ L
Tổng	60 μ L

- Đưa vào máy PCR và chạy theo chu trình nhiệt: 72°C/20 phút; 95°C/5 phút; 10 chu kỳ 95°C/15 giây, 62°C/15 giây, 70°C/1 phút; sau đó 70°C/5 phút và giữ ở 4°C.

- Tinh sạch sản phẩm bằng 108 μ L AMPure.

- Đo nồng độ DNA thư viện tự do sau tinh sạch. Bảo quản DNA tự do thư viện ở nhiệt độ từ -30°C đến -10°C.

2.4.4. Kiểm tra chất lượng DNA thư viện

Thực hiện theo quy trình của máy LabChip GX Touch 24 cho phép kiểm tra kích thước thư viện (DNA tự do đã được gắn barcode và adaptor) và nồng độ thư viện (có thể phát hiện ở nồng độ thấp) trước khi tiến hành các bước khuếch đại và làm giàu trong hệ thống Ion Chef. Các bước tiến hành theo quy trình của nhà sản xuất. Kết quả điện di được phân tích bằng phần mềm Labchip.

Kích thước DNA tự do trong huyết tương phân bố trong khoảng 140-180bp, kích thước đoạn adaptor P1 và barcode khoảng 80bp, do đó kích thước thư viện sẽ có đỉnh đơn tại 220 - 260bp và nồng độ thường trong khoảng 1.000 - 10.000pM.

Thư viện đã được gắn mã vạch được pha loãng xuống 55pM. Mỗi chip giải trình tự tối đa được 14 mẫu/lần, tổ hợp hỗn hợp thư viện đồng đều của 14 mẫu để có hỗn hợp thư viện $\geq 25\mu$ L.

2.5. Chuẩn bị mẫu giải trình tự và giải trình tự

2.5.1. Chuẩn bị mẫu giải trình tự (Ion Chef)

Mẫu DNA thư viện tự do sau khi được pha loãng đạt nồng độ 55pM sẽ được làm giàu một lần nữa trong hệ thống tự động Ion Chef sử dụng bộ kit Ion PI Hi-Q Chef. Mẫu DNA thư viện tự do được làm giàu sẽ được nạp tự động vào Ion PI Chip V3. Các bước thao tác tự động trong hệ thống Ion Chef. Phản ứng emulsion PCR (ePCR) trong đó có hạt Ion Sphere Particle (ISP). Trong điều kiện tối ưu, trong 1 giọt dầu môi trường ePCR chỉ chứa 1 hạt ISP và 1 đoạn DNA tự do thư viện và các thành phần phản ứng PCR. Hạt ISP sau khi được làm giàu sẽ được tinh sạch bằng hạt từ đặc hiệu với Biotin có gắn trên đầu gắn barcode. Bước kế tiếp là nạp dung dịch chứa các hạt ISP đã được làm giàu vào trong Ion PI Chip V3. Các bước chuẩn bị máy Ion chef được thực hiện như sau:

- 40 phút trước khi chạy, mở hóa chất Ion PI Hi-Q Chef và để ấm tới nhiệt độ phòng.
- Tạo lịch trình chạy trên trình duyệt web Ion Torrent.
- Bổ sung 25 μ L thư viện vào các ống mẫu trên giá hóa chất Hi-Q Chef Cartridge.
- Lắp các đồ nhựa tiêu hao vào máy Ion Chef.
- Đưa Ion PI Chip V3 vào máy.
- Đảm bảo các thông tin truy cập trên Ion Chef là chính xác.
- Chọn thời gian để quy trình hoàn thành và bắt đầu chu trình chạy.

2.5.2. Giải trình tự trên máy Proton

- Trước khi khởi động thiết bị 40 phút, đưa các hóa chất sử dụng tới nhiệt độ phòng. Đảm bảo trong máy có sẵn 1 con chip đã qua sử dụng để khởi động máy. Khởi động máy.

- Rửa máy bằng dung dịch Chlorite và nước. Khởi động máy Proton với NaOH và Wash 2. Khi nồng độ pH của Wash 2 đã đạt, chuẩn bị các ống dung dịch dNTPs (Deoxyribonucleoside triphosphates). Khởi động chu trình rửa đường chất lỏng với chip đã sử dụng.

- Khi các bước đã hoàn thành, đưa chip từ Ion Chef đã hoàn thành vào máy Ion Torrent. Khi hệ thống đã xác nhận chip và thông tin của quy trình chạy, tiến hành chu trình giải trình tự. Bảo quản chip còn lại trong hộp kín tại 4°C. 20 phút trước khi thực hiện chu trình chạy thứ 2, để chip ở nhiệt độ phòng.

- Dữ liệu giải trình tự được chuyển trực tiếp vào thư mục DNA trong máy chủ của hệ thống Ion Torrent (Ion Torrent Server). Dữ liệu được phân tích tự động trong máy chủ trong 8 - 12 giờ.

2.5.3. Phân tích kết quả giải trình tự.

Sau quá trình giải trình tự, dữ liệu sẽ được chuyển sang hệ thống Ion Torrent Server. Dữ liệu thô ban đầu gồm các đoạn đọc có kích thước khác nhau. Dữ liệu của mỗi mẫu được nhận biết thông qua trình tự barcode. Tiếp theo, các đoạn đọc được cắt (trimming) dần từ đầu 3' (nhằm loại bỏ trình tự barcode), sau đó lọc (filtering) giữ lại đoạn đọc có kích thước < 167 bp. Toàn bộ trình tự đoạn đọc còn lại được giống hàng và so sánh với trình tự chuẩn bộ gen người (hg19) sử dụng TMAP (Torrent Mapping Alignment Program). Tiếp theo, những đoạn đọc được giữ lại là những đoạn đọc chỉ xuất hiện tại 1 vị trí duy nhất trên bộ gen được gọi là các unique reads (URs). Các đoạn đọc không tương đồng hoặc tương đồng nhiều hơn 1 vị trí trên bộ gen sẽ được lọc bỏ.

Phụ lục 3

QUY TRÌNH LẤY MẪU ÓI

Thực hiện theo QTKT-CĐTS, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Bác sỹ chuyên khoa và điều dưỡng (y tá).

2. Phương tiện

- Máy siêu âm với các đầu dò chuyên dụng.
- Dung dịch sát khuẩn da (cồn povidine 10%), bơm tiêm 5mL, dây nối có khóa 3 chạc, bông, băng dính phẫu thuật.
- Găng tay, áo, mũ, khẩu trang phẫu thuật.
- Bộ dụng cụ can thiệp vô trùng: kẹp, cốc kim loại, khay quả đậu, xe đẩy có mặt bàn đựng dụng cụ.
- Kim chọc hút chuyên dụng (BBrawn G27).

3. Người bệnh

- Người bệnh được giải thích kỹ về thủ thuật để phối hợp với thầy thuốc.
- Người bệnh được khám tiền mê trước khi thực hiện thủ thuật.
- Hướng dẫn đi tiểu không để bàng quang căng.
- Cho người bệnh nằm, sát trùng da, sau đó phủ khăn phủ vô khuẩn có lỗ.

4. Phiếu xét nghiệm

- Hồ sơ bệnh án điều trị nội trú.
- Có biên bản hội chẩn chỉ định thực hiện thủ thuật đã được thông qua.

CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Giải thích cho người bệnh.
- Xem xét chỉ định, chống chỉ định.
- Tiến hành trong phòng thủ thuật: 3 lần kiểm tra thông tin người bệnh: đôi khớp bệnh nhân nằm trên giường với hồ sơ bệnh án và thông tin trên ống lấy mẫu.
- Thủ thuật viên rửa tay, đeo khẩu trang, đeo găng, áo phẫu thuật vô khuẩn.
- Y tá (điều dưỡng) sát khuẩn rộng vị trí chọc kim.
- Bác sĩ xuyên kim vào buồng ối dưới hướng dẫn của siêu âm.
- Y tá (điều dưỡng) nối dây nối có khóa 3 chạc với đốc kim rồi dùng bơm tiêm rút ra khoảng 10mL dịch ối. Mẫu dịch này được bảo quản và chuyển đến phòng xét nghiệm.
- Kết thúc thủ thuật, băng ép nhẹ vùng chọc.
- Người bệnh được theo dõi tại phòng lưu 1 - 2 giờ.

Phụ lục 4

QUY TRÌNH NUÔI CẤY DỊCH ỒI LÀM NST ĐỒ

Thực hiện theo QTKT-DTTB-02, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

1. Nuôi cấy tế bào ối:

- 10mL dịch ối vào 2 ống Falcon vô trùng (quy trình lấy mẫu ối).
- Ly tâm 800vòng/phút x 10 phút.
- Loại bỏ dịch nổi, giữ lại phần lắng cặn khoảng 0,5mL trong có chứa các tế bào ối.
- Bổ sung 4mL dung dịch Amniomax vào mỗi ống, trộn đều, chuyển vào chai nuôi cấy.
- Nuôi cấy tế bào trong tủ ấm 37°C với 5% CO₂ trong vòng 10 – 15 ngày.

2. Thu hoạch tế bào ối

Sau khi nuôi cấy 10 – 15 ngày, kiểm tra trên kính hiển vi soi ngược khi thấy hình ảnh nhiều tế bào phân chia:

- Dừng quá trình phân bào ở kỳ giữa bằng 0,1mL Colcemid. Để tủ ấm 37° C với 5% CO₂ trong vòng 3 giờ.
- Làm bong tế bào khỏi thành bình nuôi cấy bằng 3mL Trypsin 0,25% để tủ ấm 5 phút.
- Ly tâm 1800vòng/phút x 10 phút loại bỏ dịch nổi, lấy 0,5mL phần lắng cặn chứa tế bào.
- Sốc nhược trương phá vỡ màng tế bào bằng dung dịch KCl 0,75M. Lúc này các NST được bung ra khỏi màng tế bào, ly tâm lấy phần lắng cặn.
- Cố định và làm sạch mẫu bằng dung dịch Carnoy (Acid acetic:Methanol = 1:3) 3 lần.

- Ly tâm 1800 vòng/phút x 10 phút, lấy khoảng 0,5 - 1mL phần lắng cặn có chứa các cụm NST và nhân tế bào.

- Nhỏ dịch thu được lên lam kính.

- Nhuộm tiêu bản theo phương pháp nhuộm băng G.

3. Nhuộm tiêu bản

Các tế bào ồi sau khi thu hoạch được nhuộm bằng phương pháp nhuộm băng G để đánh giá các bất thường về số lượng và cấu trúc NST

Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất:

Dụng cụ:

5 cốc thủy tinh loại 100mL để đựng hóa chất và thuốc nhuộm.

2 cốc mở thủy tinh loại 500mL đựng nước rửa tiêu bản.

Hóa chất:

Dung dịch Trypsin 0,01% (0,01g: 100mL nước muối 0,9%)

Các dung dịch đệm: KH_2PO_4 9,1g + nước cất vừa đủ 1000mL

Na_2HPO_4 11,9g + nước cất vừa đủ 1000mL

Dung dịch Giemsa 5%: Dung dịch KH_2PO_4 (đã pha ở trên): 47,5 mL

Dung dịch Na_2HPO_4 (đã pha ở trên): 47,5 mL

Dung dịch Giemsa: 5 mL.

Các bước tiến hành (thực hiện trong điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm)

Nhúng tiêu bản qua dung dịch NaCl 9‰ (100mL) khoảng 2 - 3 giây.

Đặt tiêu bản vào cốc chứa dung dịch Trypsin (100mL) đã pha ở trên khoảng 7 - 10 phút.

Rửa tiêu bản lặp lại 2 lần trong cốc đựng dung dịch NaCl 9‰ .

Tiêu bản được nhuộm bằng thuốc nhuộm Giemsa 5% khoảng 10 - 15 phút.

Tất cả các tiêu bản nhuộm xong được rửa bằng cách nhúng qua 3 cốc nước sạch hoặc rửa dưới vòi nước chảy nhẹ để loại bỏ cặn thuốc nhuộm thừa.

Đề tiêu bản khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm.

*** *Đánh giá***

- Phân tích trên kính hiển vi với độ phóng đại x 1000 lần có chức năng chụp ảnh kết nối với hệ thống máy tính có phần mềm phân tích NST.

- Các cụm NST đủ tiêu chuẩn phân tích là những cụm có NST phân tán tốt, không chồng lên nhau, còn nền bào tương, kích thước NST không dài quá cũng không ngắn quá, băng rõ.

- Các cụm NST được phân tích về số lượng và cấu trúc:

+ Về số lượng: cụm 45, 46 hay 47 NST.

+ Về cấu trúc NST: bình thường và đột biến (chuyển đoạn, nhân đoạn, mất đoạn...).

- Mỗi mẫu được phân tích 30 cụm NST ở kỳ giữa, trường hợp khám phân tích 100 cụm NST.

Phụ lục 5
PHIẾU THÔNG TIN BỆNH NHÂN

I. Thai phụ

Họ và tên: Mã số:
Địa chỉ: Năm sinh:
Nghề nghiệp: Điện thoại:
Cân nặng (kg): Chiều cao (cm):
Tiền sử nội khoa:
Tiền sử mang thai bất thường: Loại bất thường:
Ngày lấy mẫu:

II. Thai nhi

Ngày siêu âm: Tuổi thai:
CRL (chiều dài đầu mông): NT (độ mờ da gáy):
Kết quả xét nghiệm:
Sàng lọc kết hợp thai kỳ 1
(CFTS):
Triple test:

III. Gia đình

- Gia đình bên chồng, bên vợ có ai bị sảy thai, thai chết lưu hoặc thai bất thường không?

- Gia đình bên chồng, bên vợ có ai mắc hoặc sinh con mắc các bệnh tật di truyền không? Đặc biệt các bệnh: Down, chậm phát triển trí tuệ....