Ứng dụng phân tích di truyền liên kết sử dụng trình tự lặp lại ngắn trong chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh Pompe

Nguyễn Văn Phong[1], Triệu Tiến Sang[1*], Trần Văn Khoa[1], Đặng Thị Hồng[1], Trần Văn Tuấn[2]

[1]Bộ môn Sinh học - Di truyền y học, Học viện Quân y, 160 Phùng Hưng, phường Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam
[2]Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, Học viện Quân y, 222 Phùng Hưng, phường Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/5/2025; ngày chuyển phản biện 22/5/2025; ngày nhận phản biện 6/6/2025; ngày chấp nhận đăng 12/6/2025

Tóm tắt:

Bệnh Pompe là bệnh rối loạn dự trữ glycogen di truyền lặn do bất thường gen *GAA* gây thiếu hụt enzym acid alpha-glucosidase. Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ hiện đang là phương pháp dự phòng bệnh hiệu quả. Nghiên cứu khuếch đại 6 chỉ thị trình tự lặp lại ngắn (STR) (D17S802, D17S1806, D17S784, D17S78.0, D17S78.57, D17S928) gần gen *GAA* bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymerase đa bội (Multiplex-PCR), phục vụ phân tích di truyền liên kết trên 17 thành viên và 23 mẫu phôi sinh thiết của 5 gia đình có tiền sử sinh con mắc bệnh Pompe. Kết quả khuếch đại được so sánh với kết quả giải trình tự gen Sanger. Kết quả phân tích di truyền liên kết và giải trình tự Sanger cho thấy trùng khớp ở 22/23 (95,65%) mẫu phôi, ngoại trừ 1/23 (4,35%) mẫu chẩn đoán trực tiếp sai do hiện tượng mất alen. Kỹ thuật phân tích di truyền liên kết sử dụng bộ 6 STR nằm gần gen *GAA* khuếch đại bằng Multiplex-PCR đã được ứng dụng thành công trong chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh Pompe. Kỹ thuật có độ chính xác cao, giúp giảm nguy cơ chẩn đoán sai do hiện tượng mất alen và phù hợp với điều kiện thực tiễn tại Việt Nam.

Từ khoá: **chẩn đoán di truyền tiền làm tổ cho bệnh lý đơn gen, gen *GAA*, Pompe, trình tự lặp lại ngắn.**

Chỉ số phân loại: **3.1, 3.2, 3.5**

Application of short tandem repeat based linkage analysis in preimplantation genetic testing for Pompe disease

Van Phong Nguyen[1], Tien Sang Trieu[1*], Van Khoa Tran[1], Thi Hong Dang[1], Van Tuan Tran[2]

[1]Department of Biology and Medical genetics, Vietnam Military Medical University, 160 Phung Hung Street, Ha Dong Ward, Hanoi, Vietnam
[2]Military Institute of Clinical Embryology and Histology, Vietnam Military Medical University, 222 Phung Hung Street, Ha Dong Ward, Hanoi, Vietnam

Received 21 May 2025; revised 6 June 2025; accepted 12 June 2025

Abstract:

Pompe disease is an autosomal recessive glycogen storage disorder caused by genetic alterations in the *GAA* gene, leading to a deficiency of the enzyme acid alpha-glucosidase. Preimplantation genetic testing for monogenic disorders (PGT-M) is an effective method for the prevention of Pompe disease. Six short tandem repeats (STR) markers (D17S802, D17S1806, D17S784, D17S78.0, D17S78.57, and D17S928) flanking the *GAA* gene were amplified using Multiplex polymerase chain reaction (Multiplex-PCR) for linkage analysis in 17 family members and 23 biopsied embryo samples from five families with a history of Pompe disease. Linkage analysis results were compared with Sanger sequencing. Linkage analysis and Sanger sequencing results were consistent in 22 out of 23 embryo samples (95.65%), except for one embryo (4.35%) that was misdiagnosed directly due to allelic dropout. Linkage analysis using a panel of 6 STRs near the *GAA* gene amplified by Multiplex-PCR has been successfully applied in PGT-M for Pompe disease. This technique is highly reliable, helps reduce the risk of misdiagnosis due to allelic dropout, and is compatible with current clinical practice in Vietnam.

Keywords: ***GAA*** **gene, Pompe, preimplantation genetic testing for monogenic disorders, short tandem repeats.**

Classification numbers: **3.1, 3.2, 3.5**

[*]Tác giả liên hệ: Email: trieusangk83@yahoo.com.vn

1. Đặt vấn đề

Bệnh Pompe (GSD-II) là bệnh di truyền lặn đơn gen do đột biến gen *GAA* trên nhiễm sắc thể số 17 (vùng 17q25.3) gây thiếu hụt enzym alpha-glucosidase, dẫn tới tích tụ glycogen trong lysosome và tổn thương cơ quan. Bệnh được phân loại gồm hai thể: thể khởi phát sớm với các triệu chứng yếu cơ nặng; và thể khởi phát muộn với biểu hiện lâm sàng nhẹ hơn [1, 2]. Tỷ lệ mắc bệnh thay đổi theo chủng tộc, ước tính tỷ lệ trẻ sơ sinh mắc bệnh trung bình trên thế giới qua nhiều nghiên cứu khoảng 1/18.711 [3]. Ở Việt Nam vẫn chưa có nghiên cứu nào đưa ra tỷ lệ mắc bệnh Pompe, bệnh nhân đầu tiên được chẩn đoán xác định bệnh Pompe vào năm 2015 và thống kê đến năm 2021, tại Bệnh viện Nhi Trung ương đã có 52 bệnh nhân Pompe được chẩn đoán, trong đó 28 bệnh nhân được điều trị liệu pháp thay thế enzym (Enzyme replacement therapy - ERT) [4].

Hiện nay, ERT đã được triển khai trong điều trị bệnh Pompe và mang lại cải thiện đáng kể về lâm sàng [4]. Tuy nhiên, chi phí điều trị rất cao và bệnh nhân cần duy trì điều trị suốt đời. Do đó, dự phòng thông qua chẩn đoán trước sinh và chẩn đoán di truyền tiền làm tổ cho nhóm bệnh lý đơn gen (Preimplantation genetic testing for monogenic disorders - PGT-M) là chiến lược quan trọng nhằm giảm gánh nặng bệnh tật.

Việc thực hiện PGT-M đối với bệnh Pompe gặp nhiều thách thức, đặc biệt trong việc xác định chính xác biến thể bệnh trên mẫu DNA phôi, do dễ xảy ra hiện tượng mất alen (Allele dropout - ADO) và hiện tượng khuếch đại ưu tiên. Phân tích di truyền liên kết thông qua các chỉ thị đa hình gần gen bệnh đang là phương pháp bổ trợ đáng tin cậy giúp tăng độ chính xác chẩn đoán. Theo khuyến cáo của Hội Sinh sản và phôi học châu Âu (ESHRE) năm 2020, phân tích di truyền liên kết, hoặc kết hợp với phát hiện biến thể gen gây bệnh trực tiếp, được xem là "tiêu chuẩn vàng" trong PGT-M cho các bệnh đơn gen [5]. Tuy nhiên, phương pháp sử dụng đa hình đơn nucleotide (Single nucleotide polymorphism - SNP) hiện nay thường yêu cầu kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (Next-generation sequencing - NGS) với chi phí cao, chưa phổ biến rộng rãi ở Việt Nam. Ngược lại, các chỉ thị STR vẫn được ưa chuộng nhờ khả năng khuếch đại hiệu quả bằng PCR và chi phí hợp lý. Xuất phát từ thực tiễn, nghiên cứu này, với mục tiêu ứng dụng phân tích di truyền liên kết sử dụng các chỉ thị STR nhằm phục vụ sàng lọc phôi mang biến thể gây bệnh Pompe trong các gia đình có tiền sử bệnh lý, góp phần hỗ trợ chẩn đoán di truyền tiền làm tổ chính xác và đánh giá hiệu quả ứng dụng trong thực tiễn điều kiện lâm sàng tại Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu gồm mẫu máu ngoại vi của 17 thành viên thuộc 5 gia đình có tiền sử sinh con mắc bệnh Pompe, cùng 23 mẫu phôi sinh thiết ngày 5-6 có được từ các cặp vợ chồng này. Tất cả các mẫu được thu thập tại Viện Mô phôi lâm sàng quân đội, Học viện Quân y. Các cặp vợ chồng đã được tư vấn di truyền và đồng ý thực hiện PGT-M bệnh Pompe.

Ở mỗi gia đình, người con mắc bệnh Pompe đã được xác định biến thể gây bệnh trên gen *GAA* bằng giải trình tự NGS hoặc giải trình tự toàn bộ exon gen *GAA*, cụ thể:

Gia đình 01: Con trai bị bệnh mang kiểu gen đồng hợp tử biến thể *GAA*: c.1933G>C (p.Asp645His). Bảy mẫu phôi sinh thiết của gia đình gồm Q1-Q7.

Gia đình 02: Con gái bị bệnh mang kiểu gen dị hợp tử phức biến thể *GAA*: c.2563G>C (p.Gly855Arg) và *GAA*: c.625T>C (p.Tyr209His). Năm mẫu phôi sinh thiết của gia đình gồm P1-P5.

Gia đình 03: Con trai bị bệnh mang kiểu gen đồng hợp tử *GAA*: c.625T>C (p.Tyr209His). Bảy mẫu phôi sinh thiết của gia đình gồm D1-D7.

Gia đình 04: Con gái bị bệnh mang kiểu gen dị hợp tử phức biến thể *GAA*: c.1933G>C (p.Asp645His) và *GAA*: c.322T>C (p.Cys108Arg). Ba mẫu phôi sinh thiết của gia đình gồm H1-H3.

Gia đình 05: Con trai bị bệnh mang kiểu gen đồng hợp tử biến thể *GAA*: c.1933G>C (p.Asp645His). Một mẫu phôi sinh thiết của gia đình là QT1.

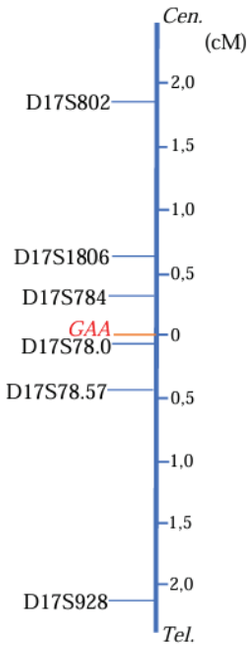
2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu tiến hành tại Bộ môn Sinh học - Di truyền y học, Học viện Quân y.

2.2.1. Tách chiết DNA từ máu ngoại vi và nhân bản bộ gen phôi

Mẫu máu ngoại vi của thành viên trong gia đình được tách chiết DNA sử dụng bộ kit G-spin™ Total DNA Extraction (iNtRON Biotechnology) theo quy trình chuẩn của hãng. Mẫu phôi sinh thiết được khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng bộ kit REPLI-g® Single Cell (QIAGEN) theo quy trình chuẩn của hãng. Sản phẩm khuếch đại sau đó được pha loãng đạt nồng độ 10-20 ng/µl, DNA tổng số sau tách chiết và sản phẩm sau WGA được bảo quản ở -20°C trước khi tiến hành các phân tích di truyền tiếp theo.

2.2.2. Phân tích di truyền liên kết



Hình 1. Bản đồ vị trí các chỉ thị STR xung quanh gen *GAA* (1 cM ~1 Mb).

Bộ chỉ thị STR liên kết gen *GAA* sử dụng cho phân tích di truyền liên kết được lựa chọn bao gồm: D17S802, D17S1806, D17S784, D17S78.0, D17S78.57, D17S928. Cả 6 STR đã được sử dụng cùng nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 17 (hình 1). Trình tự các STR D17S802, D17S1806, D17S784 và D17S928 được tham khảo trên cơ sở dữ liệu UCSC Genome Browser, và các STR: D17S78.0 và D17S78.57 được nhóm nghiên cứu tự thiết kế sử dụng công cụ Primer BLAST (NCBI) (bảng 1). Các cặp mồi được tổng hợp và cung cấp bởi Công ty Integrated DNA Technologies (Hoa Kỳ).

Mỗi mẫu được khuếch đại bằng hai phản ứng Multiplex-PCR (set 1: D17S802, D17S784, D17S1806; set 2: D17S78.0, D17S78.57, D17S928) với thể tích 25 µl, gồm 12,5 µl MyTaq HS Mix 2X (Meridian Bioscience); 0,5 µl mỗi mồi (nồng độ 10 pmol/µl); 4,5 µl nước và 5,0 µl DNA. Chu trình nhiệt với các bước như sau: biến tính 95°C trong 5 phút, 40 chu kỳ [biến tính 95°C-30 giây, bắt cặp với thời gian 30 giây tại 54,5°C (set 1) và 59,5°C (set 2), kéo dài chuỗi 72°C-30 giây)], kết thúc bằng giai đoạn kéo dài 10 phút ở 72°C và giữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 3%, sau đó pha 1 µl sản phẩm này với 11,5 µl Hi-Di formamide, 0,5 µl GeneScan™ LIZ 500 và biến tính ở 95°C trong 5 phút. Mẫu sau biến tính được điện di mao quản trên máy SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ). Kết quả được phân tích bằng phần mềm GeneMapper ID6.0. Kiểu gen STR của bố-mẹ-con bị bệnh được phân tích để luận giải alen liên kết với các biến thể gen gây bệnh, từ đó kết luận kiểu gen của mỗi phôi.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng khuếch đại các chỉ thị trình tự lặp lại ngắn.

Chỉ thị trình tự lặp lại ngắn	Trình tự (5'-3')	Kích thước (bp)	Khoảng cách đến gen *GAA* (vị trí theo GRCh38/hg38)
D17S802 (AFM210XA5)	5'-/FAM/-GCCACCTGCCCCTCAA-3' 5'-CTGCCAGCAGAGGCCA-3'	≈196 bp	1,8 cM (78.238.445- 78.238.716)
D17S1806 (AFMA238YB5)	5'-/FAM/-GATGTGCTTATTTGAAACCTGC-3' 5'-TGTAACGTCCACCAGCAGAG-3'	≈131 bp	0,6 cM (79.449.450-79.449.737)
D17S784 (AFM044XG3)	5'-/FAM/-GAGTCTCCTAAATGCTGGGG-3' 5'-AGCTCCTGCACAGTTCTTAAATA-3'	≈252 bp	0,3 cM (79.828.322-79.828.625)
D17S78.0	5'-/FAM/-TGGGTGACAGAGCTGGAC-3' 5'-AGCAGTTTTATGGGGAAAG-3'	≈122 bp	0,02 cM (80.127.616-80.127.719)
D17S78.57	5'-/FAM/-TATCCAGAAGAGCTGCTCAGT-3' 5'-AGGTTGAGGCTGCAGTGATC-3'	≈232 bp	0,48 cM (80.598.784-80.598.998)
D17S928 (AFM217YD10)	5'-/FAM/-TAAAACGGCTACAACACATACA-3' 5'-ATTTCCCCACTGGCTG-3'	≈167 bp	2,2 cM (82.294.963-82.295.264)

Bảng 2. Trình tự mồi khuếch đại các đoạn chứa biến thể gen *GAA*.

Biến thể	Mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước (bp)
GAA:c.1933G>C (p.Asp645His)	1933. F	5'-TGAGGACCAGCCTGACTCT-3'	230
	1933. R	5'-CTTGGGTGGGTGGGATCG-3'	
GAA:c.2563G>C (p.Gly855Arg)	2563. F	5'-TGCTGTACCAGCCTAGCATTC-3'	246
	2563. R	5'-CCAGGAAGATGACCTGTGTGTAG-3'	
GAA: c.322T>C (p.Cys108Arg)	322. F	5'-CTGACAAGGCCATCACCCA -3'	246
	322. R	5'-CAGTCTCCATCATCACGTCCAG -3'	
GAA:c.625T>C (p.Tyr209His)	625. F	5'-CGGGTTGTTCTCTGGAGAG-3'	274
	625. R	5'-CTCCCTGCCGTGTGAGAAAT-3'	

2.2.3. Giải trình tự gen Sanger

Các đoạn trình tự DNA chứa biến thể quan tâm (tùy theo từng trường hợp gia đình) được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu thiết kế bằng công cụ Primer BLAST (NCBI), dựa trên trình tự tham chiếu nhiễm sắc thể 17 (GRCh38/NC_000017.11) chứa gen *GAA* (bảng 2). Phản ứng PCR thực hiện với tổng thể tích 25 µl gồm DNA (khoảng 50 ng); nước; 12,5 µl GotaqGreen Mastermix 2X (Promega); 0,5 µl mỗi mồi (nồng độ 10 pmol/µl); chu trình nhiệt: 95°C-5 phút; 40 chu kỳ (95°C-30 giây, 56°C-30 giây, 72°C-30 giây); và 72°C-10 phút.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific), giải trình tự một chiều sử dụng các mồi: 1933.R, 2563.F, 322.R và 625.F bằng bộ kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific), sau đó tinh sạch bằng BigDye XTerminator™ Purification Kit theo quy trình hướng dẫn của hãng (bảng 2). Điện di mao quản trên máy SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ). Dữ liệu giải trình tự được phân tích bằng phần mềm BioEdit Sequence Alignment Editor xác định trực tiếp biến thể gây bệnh trên gen.

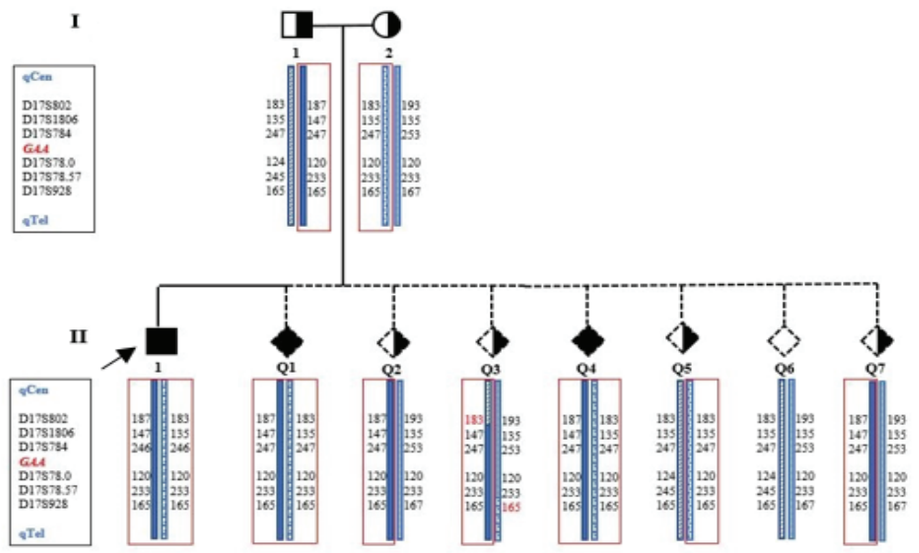
2.3. Đạo đức nghiên cứu

Dữ liệu của các đối tượng trong nghiên cứu được bảo mật. Nghiên cứu được thực hiện phù hợp với các quy định đạo đức trong nghiên cứu y sinh học, theo Quyết định số 1068/2019/VMMU-IRB của Học viện Quân y. Nghiên cứu không nhận tài trợ từ bất kỳ tổ chức hoặc nguồn kinh phí bên ngoài nào và cam kết không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến công trình này.

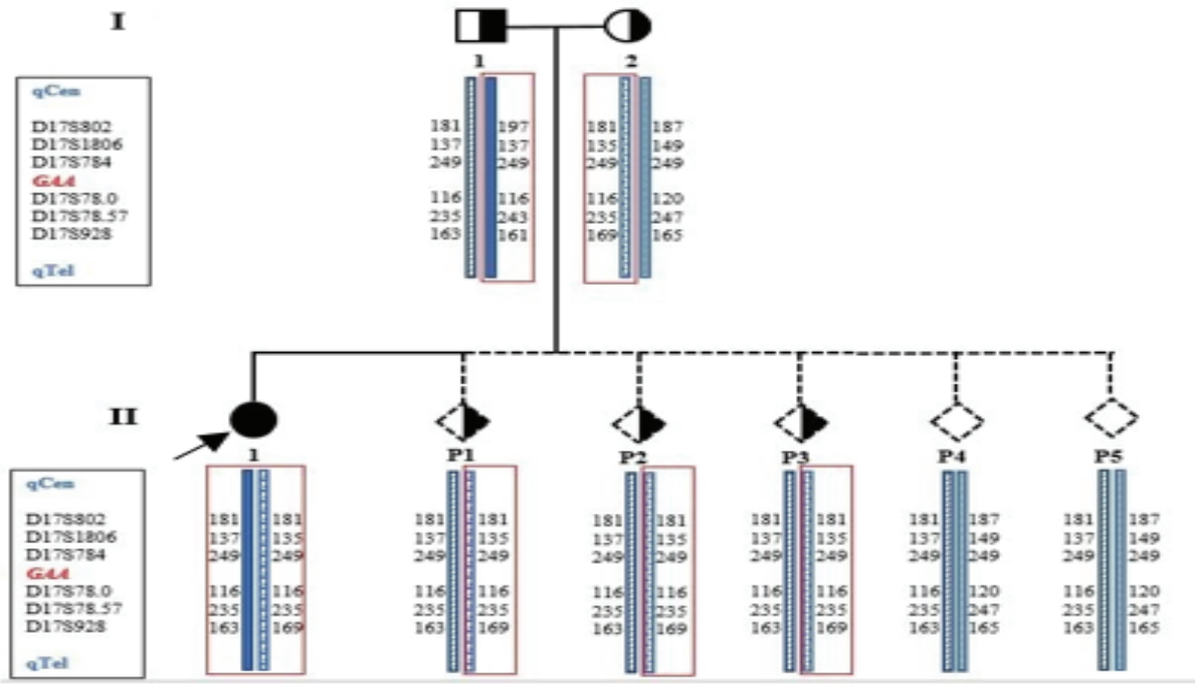
3. Kết quả

3.1. Kết quả phân tích di truyền liên kết và giải trình tự gen Sanger

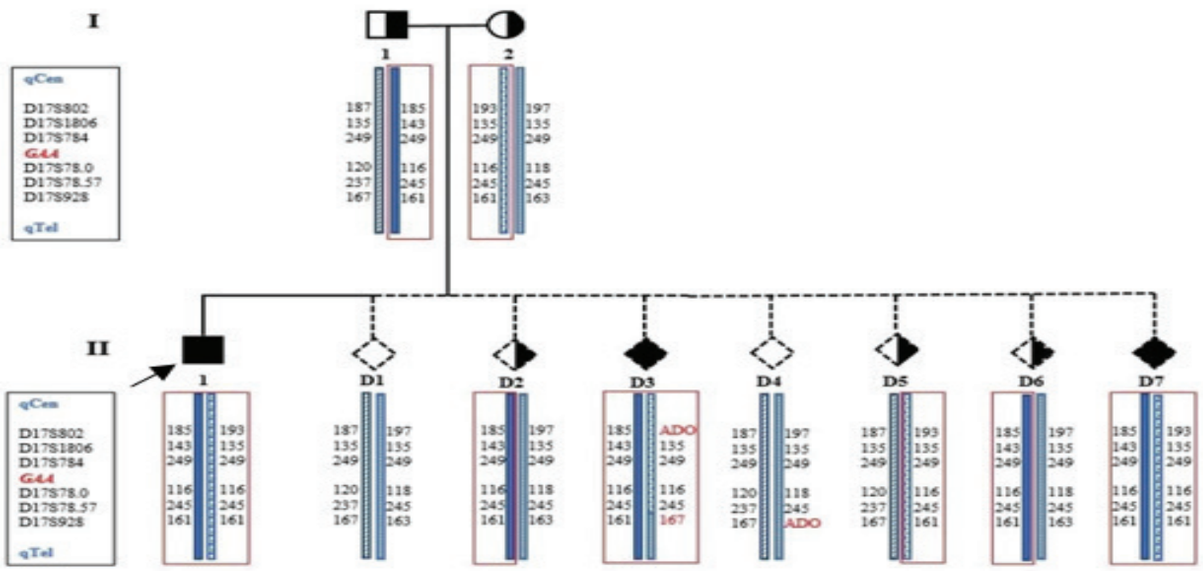
Phân tích kết quả điện di mao quản và lập thống kê dữ liệu STR trên các phôi (hình 2-6) cho thấy, hiện tượng ADO xảy ra trên hai locus D17S802 và D17S928 với tỷ lệ là 2/23



Hình 2. Phả hệ của gia đình số 1 với các kiểu haplotype của các chỉ thị trình tự lặp lại ngắn liên kết gen *GAA*.



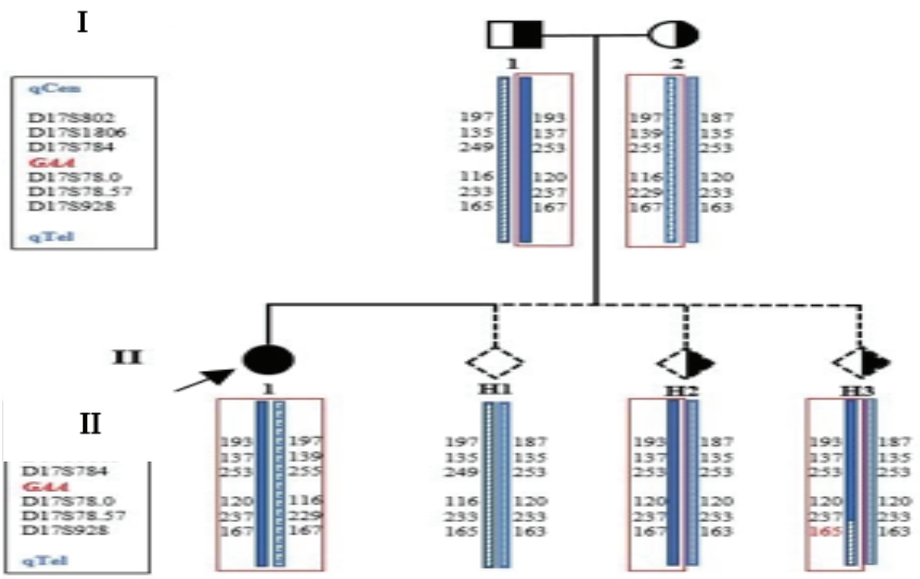
Hình 3. Phả hệ của gia đình số 2 với các kiểu haplotype của các chỉ thị trình tự lặp lại ngắn liên kết gen *GAA*.



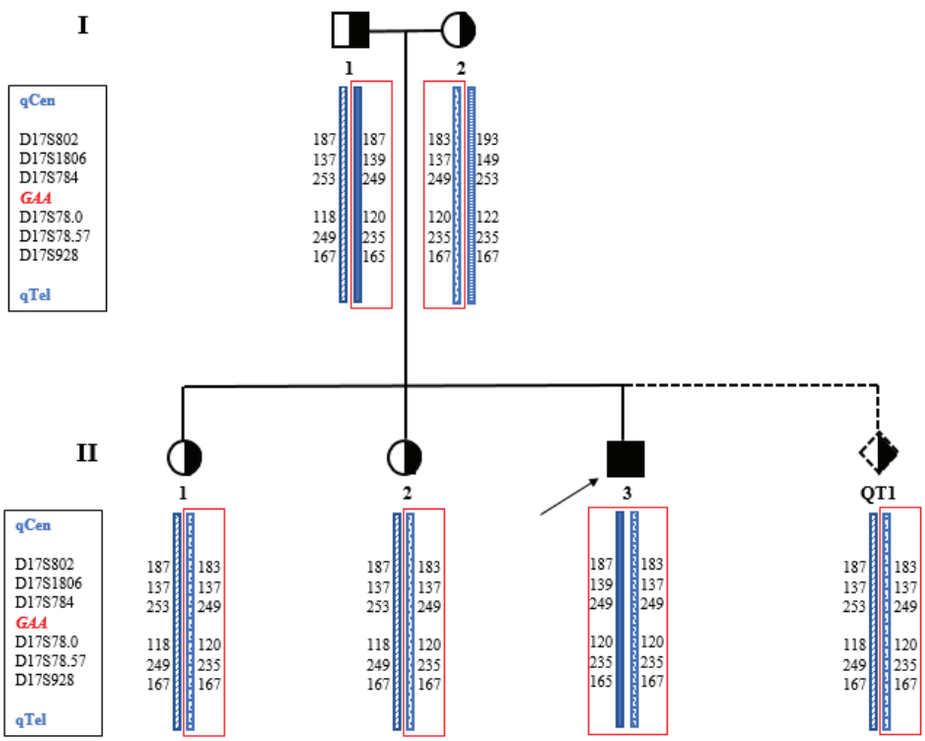
Hình 4. Phả hệ của gia đình số 3 với các kiểu haplotype của các chỉ thị trình tự lặp lại ngắn liên kết gen *GAA*.

phôi (khoảng 8,69%). Tỷ lệ xảy ra trao đổi chéo trên locus D17S802 và D17S928 (do hiện tượng tiếp hợp trao đổi chéo trong kỳ đầu giảm phân I) là 1/23 phôi (4,34%) và 3/23 phôi (13,04%) (hình 2, 4 và 5).

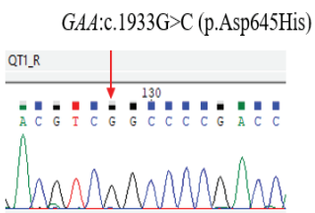
Kết quả phân tích di truyền liên kết trên các mẫu phôi cho thấy, trùng khớp với kết quả giải trình tự Sanger, ngoại trừ trường hợp phôi QT1 của gia đình số 5 (hình 6). Phân tích di truyền liên kết trên phôi QT1 cho kết quả phôi dị hợp tử mang alen biến thể *GAA*: c.1933G>C (p.Asp645His) có nguồn gốc di truyền từ mẹ (hình 6) nhưng kết quả giải trình tự Sanger là đồng hợp tử alen bệnh (c.1933G>C) (hình 7). Điều này cho thấy, phôi sau WGA đã xảy ra hiện tượng mất alen trên đoạn gen *GAA* chứa biến thể cần khảo sát và gây ra chẩn đoán sai trên phương pháp chẩn đoán trực tiếp.



Hình 5. Phả hệ của gia đình số 4 với các kiểu haplotype của các chỉ thị trình tự lặp lại ngắn liên kết gen *GAA*.



Hình 6. Phả hệ của gia đình số 5 với các kiểu haplotype của các chỉ thị trình tự lặp lại ngắn liên kết gen *GAA*.



Hình 7. Kết quả giải trình tự Sanger trên mẫu phôi QT1 gia đình số 5. Biến thể được đánh dấu bởi mũi tên đỏ. Trình tự được đọc bằng mồi ngược.

3.2. Kết quả phân tích kiểu gen các locus STR

Khảo sát dữ liệu trên cỡ mẫu nhỏ (5 cặp vợ chồng) từ 5 gia đình không cùng huyết thống tại Việt Nam cho thấy, các locus STR có tỷ lệ kiểu gen dị hợp tử dao động từ 0,5 đến 0,9, số loại alen phát hiện từ 4 đến 8 loại alen, phản ánh tính đa hình cao trong quần thể người Việt. Các locus như D17S802 (0,9), D17S78.0 (0,8) và D17S928 (0,8) thể hiện

Bảng 3. Dữ liệu locus STR của 5 gia đình không cùng huyết thống.

Gia đình		D17S802	D17S1806	D17S784	D17S78.0	D17S78.57	D17S928
1	I.1	183/187	135/147	247/247	120/124	233/245	165/165
	I.2	183/193	135/135	247/253	120/120	233/233	165/167
2	I.1	181/197	137/137	249/249	116/116	235/243	161/163
	I.2	181/187	135/149	249/249	116/120	235/247	165/169
3	I.1	185/187	135/143	249/249	116/120	237/245	161/167
	I.2	193/197	135/135	249/249	116/118	245/245	161/163
4	I.1	193/197	135/137	249/253	116/120	233/237	165/167
	I.2	187/197	135/139	253/255	116/120	229/233	163/167
5	I.1	187/187	137/139	249/253	118/120	235/249	165/167
	I.2	183/193	137/149	249/253	120/122	235/235	167/167
Số loại alen		6	6	4	5	8	5
Tỷ lệ kiểu gen dị hợp		0,9	0,7	0,5	0,8	0,7	0,8

I.1: bố; I.2: mẹ.

tính đa dạng di truyền cao. Ngược lại, locus D17S784 chỉ đạt tỷ lệ kiểu gen dị hợp tử là 0,5, mức tương đối thấp với khả năng phân biệt nhận diện cá thể hạn chế (bảng 3).

4. Bàn luận

Qua kết quả nghiên cứu, phân tích di truyền liên kết sử dụng các chỉ thị STR gần gen *GAA* là phương pháp khả thi và đáng tin cậy trong thực hiện PGT-M bệnh Pompe tại Việt Nam. Trong nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam về chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh Pompe (2023), tác giả N.T. Tung và cs (2023) [6] đã sử dụng ba chỉ thị STR, tuy nhiên, khả năng phân tích còn hạn chế do số lượng chỉ thị di truyền ít và có hiện tượng đồng hợp tử tại một locus STR. Do vậy nghiên cứu này mở rộng lên 6 chỉ thị STR, giúp tăng mức độ đa hình, cải thiện khả năng phân biệt kiểu gen và nâng cao độ chính xác trong phân tích di truyền liên kết. 6 STR được chọn (D17S802, D17S1806, D17S784, D17S78.0, D17S78.57 và D17S928) đều nằm trong vùng liên kết chặt chẽ với gen *GAA* trên nhánh dài nhiễm sắc thể 17. Kết quả phân tích từ 23 phôi và 5 gia đình cho thấy, tỷ lệ kiểu gen dị hợp tử cao tại hầu hết các locus, đặc biệt là D17S802 (0,9), D17S78.0 (0,8) và D17S928 (0,8), cho thấy khả năng ứng dụng cao trong xác định haplotype bệnh, thiết lập bản đồ di truyền liên kết trong các gia đình người Việt Nam và PGT-M. Ngược lại, locus D17S784 chỉ đạt độ dị hợp tử 0,5, mức tương đối thấp, cho thấy khả năng phân biệt cá thể còn hạn chế. Tuy nhiên, nghiên cứu chỉ bước đầu thống kê trên cỡ mẫu nhỏ, chưa đủ lớn để phản ánh toàn diện tính đa hình của các locus STR trong toàn bộ quần thể người Việt Nam.

Sự phù hợp giữa kết quả phân tích di truyền liên kết và giải trình tự Sanger trong 22/23 mẫu phôi (95,65%), ngoại trừ một trường hợp chẩn đoán trực tiếp sai (1/23 hay 4,35%) được phát hiện nhờ phân tích di truyền liên kết do hiện tượng ADO. Điều này cho thấy độ chính xác cao của phương pháp phân tích di truyền liên kết. Hiện tượng ADO cũng được ghi nhận trong một số locus STR, điều này cho thấy đặc điểm không thể tránh khỏi khi phân tích DNA phôi sau khi tiến hành kỹ thuật khuếch đại toàn bộ hệ gen. Mặc dù, tỷ lệ ADO trong nghiên cứu này ở mức tương đối thấp (4,35%), song vẫn là nguy cơ tiềm ẩn gây chẩn đoán sai nếu thực hiện PGT-M mà không có phân tích di truyền liên kết [7]. Qua đó, khẳng định giá trị của phương pháp phân tích di truyền liên kết sử dụng STR trong kiểm soát chất lượng chẩn đoán di truyền tiền làm tổ. Tỷ lệ xảy ra hiện tượng trao đổi chéo tại các locus D17S802 và D17S928 lần lượt là 1/23 phôi (4,34%) và 3/23 phôi (13,04%), điều này phù hợp do các locus ở vị trí càng xa so với gen *GAA* thì càng dễ có khả năng trao đổi chéo trong giảm phân I (1,8 cM - D17S802 so với 2,2 cM - D17S928). Đối với các STR này, việc phân tích di truyền cần tiến hành cẩn thận vì dễ có khả năng gây ra nhầm lẫn trong xác định kiểu gen dẫn đến chẩn đoán sai.

Mặc dù, kết quả PGT-M cho phép lựa chọn phôi không mang biến thể gen gây bệnh, tuy nhiên, chẩn đoán trước sinh vẫn được khuyến cáo thực hiện nhằm xác nhận kết quả di truyền của phôi sau khi làm tổ. Theo khuyến cáo của Hội Sinh sản và phôi học châu Âu (ESHRE - 2020) và Hội Sản phụ khoa Hoa Kỳ (ACOG - 2023), chẩn đoán trước sinh nên được thực hiện sau PGT-M để đảm bảo độ chính xác tối đa và an toàn cho thai kỳ [5, 8]. PGT-M và chẩn đoán trước sinh không loại trừ lẫn nhau mà đóng vai trò bổ trợ, giúp nâng cao độ tin cậy của chẩn đoán di truyền trong dự phòng bệnh Pompe.

Việc áp dụng quy trình Multiplex-PCR, tối ưu và điện di mao quản giúp phân tích đồng thời nhiều STR phù hợp với bối cảnh lâm sàng ở các nước đang phát triển như Việt Nam - nơi kỹ thuật phân tích liên kết sử dụng SNP bằng NGS chưa phổ biến rộng rãi. Phân tích STR không chỉ có chi phí

thấp mà còn không phụ thuộc vào biến thể gen cụ thể, cho phép sử dụng linh hoạt cho các cặp mang các biến thể gen khác nhau. Trong thực tiễn PGT-M, phương pháp phân tích STR sử dụng kỹ thuật Multiplex-PCR và điện di mao quản có chi phí thấp hơn đáng kể so với các kỹ thuật dựa trên SNP array hoặc giải trình tự NGS, với quá trình giải trình tự và phân tích dữ liệu tin sinh học chuyên sâu. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, phương pháp SNP/NGS trong PGT-M có ưu thế về độ phân giải, khả năng phát hiện đồng thời các bất thường nhiễm sắc thể và giảm khả năng chẩn đoán sai do hoán vị gen, tuy nhiên lại có chi phí cao hơn và yêu cầu máy móc và công nghệ phức tạp [9]. F.R. Parikh và cs (2021) [10] cũng nhấn mạnh rằng, kỹ thuật Multiplex-PCR kết hợp STR là nền tảng ban đầu của PGT-M, đóng vai trò quan trọng trước khi các phương pháp SNP array và NGS được phổ biến rộng rãi. Gần đây, nghiên cứu của M. Hornak và cs (2024) [11] với kỹ thuật OneGene PGT sử dụng NGS tích hợp phân tích di truyền liên kết cho thấy, tiềm năng giảm chi phí và thời gian thao tác, song vẫn cần so sánh với phương pháp STR truyền thống để xác định hiệu quả kinh tế trong từng bối cảnh lâm sàng.

Một giới hạn quan trọng của phương pháp phân tích liên kết là yêu cầu bắt buộc phải so sánh thông tin di truyền với thành viên mang gen bệnh của hai bên gia đình hoặc có con đã mắc bệnh, nhằm xác định alen liên kết với biến thể gây bệnh. Do đó, phương pháp này không thể áp dụng trong các trường hợp cặp vợ chồng chưa từng sinh con mắc bệnh và không thể thu thập mẫu từ người thân mang gen bệnh khác. Việc thiết lập bộ STR hiệu quả đòi hỏi dữ liệu quần thể lớn và mang tính đặc trưng cho từng quần thể. Vì vậy, các nghiên cứu trong tương lai cần được mở rộng để chuẩn hóa bộ chỉ thị phù hợp với quần thể người Việt Nam, góp phần xây dựng chiến lược PGT-M bền vững, khả thi và ứng dụng rộng rãi trong dự phòng bệnh Pompe.

5. Kết luận

Kỹ thuật phân tích di truyền liên kết với bộ 6 STR gần gen *GAA* khuếch đại bằng Multiplex-PCR, đã được ứng dụng thành công trong chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh Pompe. Kết quả nghiên cứu cho thấy, kỹ thuật có độ tin cậy cao, giúp giảm nguy cơ chẩn đoán sai do hiện tượng mất alen, phù hợp với điều kiện thực tiễn tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] V.C. Dung, N.N. Khanh (2021), "Genotype, phenotype of infantile onset pompe diseases at National Children's Hospital", *Vietnam Medical Journal*, **498(2)**, pp.164-168, DOI: 10.51298/vmj.v498i2.200 (in Vietnamese).

[2] N.N. Khanh, V.C. Dung (2021), "Outcomes of infantile onset pompe disease patients at the National Children's Hospital", *Journal of Medical Research*, **140(4)**, pp.20-25, DOI: 10.52852/tcncyh.v140i4.126 (in Vietnamese).

[3] R. Colburn, D. Lapidus (2024), "An analysis of Pompe newborn screening data: A new prevalence at birth, insight and discussion", *Frontiers in Pediatrics*, **11**, DOI 10.3389/fped.2023.1221140.

[4] D.T.T. Mai, V.C. Dung (2021), "Frequency and causes of re-hospitalization of pompe patients with enzyme replacement therapy at the Vietnam National Children's Hospital", *Journal of Medical Research*, **140(4)**, pp.14-19, DOI: 10.52852/tcncyh.v140i4.125 (in Vietnamese).

[5] ESHRE PGT-M Working Group, F. Carvalho, C. Moutou, et al. (2020), "ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders", *Human Reproduction Open*, **2020(3)**, DOI: 10.1093/hropen/hoaa018.

[6] N.T. Tung, T.T. Sang, T.V. Khoa, et al. (2023), "Preimplantation genetic diagnosis and prenatal testing for Pompe disease", *Vietnam Medical Journal*, **527(2)**, pp.148-153, DOI: 10.51298/vmj.v527i2.5868 (in Vietnamese).

[7] C.M. Xu, S.J. Lu, S.C. Chen, et al. (2023), "Preimplantation genetic testing guidelines of International Society of Reproductive Genetics", *Reproductive and Developmental Medicine*, **7(01)**, pp.3-11, DOI: 10.1097/RD9.0000000000000033.

[8] American College of Obstetricians and Gynecologists (2020), "Preimplantation genetic testing: ACOG committee opinion, number 799", *Obstetrics and Gynecology*, **135**, pp.e133-e137, DOI: 10.1097/AOG.0000000000003714.

[9] M.D. Rycke, V. Berckmoes (2020), "Preimplantation genetic testing for monogenic disorders", *Genes*, **11(8)**, DOI: 10.3390/genes11080871.

[10] F.R. Parikh, A.S. Athalye, D.K. Kulkarni, et al. (2021), "Evolution and utility of preimplantation genetic testing for monogenic disorders in assisted reproduction - A narrative review", *Journal of Human Reproductive Sciences*, **14(4)**, pp.329-339, DOI: 10.4103/jhrs.jhrs_148_21.

[11] M. Hornak, K. Bezdekova, D. Kubicek, et al. (2024), "OneGene PGT: Comprehensive preimplantation genetic testing method utilizing next-generation sequencing", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **41(1)**, pp.185-192, DOI: 10.1007/s10815-023-02998-3.