

## KỸ THUẬT LAI HUỖNH QUANG TẠI CHỖ (FISH) TRONG CHẨN ĐOÁN HỘI CHỨNG DIGEORGE

Lê Thị Liễu, Đinh Thị Hồng Nhung, Ngô Diễm Ngọc  
Khoa Di truyền và Sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi TW

### TÓM TẮT

Hội chứng (HC) DiGeorge là một trong những hội chứng mất đoạn nhỏ nhiễm sắc thể hiếm gặp, trong đó 90% là do mất đoạn ở cánh dài nhiễm sắc thể (NST) số 22 tại vị trí 22q11.2. Tỷ lệ mắc bệnh là 1/4.000 trẻ đẻ sống. **Mục tiêu:** Phát hiện mất đoạn 22q11.2 trong HC Digeorge bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 154 bệnh nhi có nghi ngờ mắc HC DiGeorge trên lâm sàng. Sử dụng kỹ thuật FISH với đầu dò đặc hiệu D22S75 (N25) phát hiện mất đoạn 22q11.2. **Kết quả:** 46/154 (29,8%) bệnh nhân có mất đoạn 22q11.2 được chẩn đoán mắc HC DiGeorge. **Kết luận:** Kỹ thuật FISH là phương pháp hiệu quả, chính xác, nhanh chóng trong chẩn đoán xác định HC DiGeorge.

**Từ khóa:** HC DiGeorge, NST 22, mất đoạn 22q11.2, FISH.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng DiGeorge là hội chứng di truyền do mất đoạn nhỏ (microdeletion) trên cánh dài nhiễm sắc thể (NST) 22 ở vị trí 22q11.2. HC DiGeorge được miêu tả lần đầu tiên vào năm 1965 bởi tiến sĩ Angelo DiGeorge. Tỷ lệ mắc bệnh là 1/4000 trẻ đẻ sống. Đặc điểm lâm sàng của HC DiGeorge rất khác nhau, tùy theo từng cá nhân ngay cả khi những người này là người thân trong gia đình. Một bệnh nhân mắc HC DiGeorge có thể biểu hiện những đặc điểm lâm sàng này mà không biểu hiện đặc điểm khác. Các nghiên cứu đã chỉ ra hơn 180 triệu chứng lâm sàng của HC DiGeorge gây nên những vấn đề ở các phần và bộ phận khác nhau của cơ thể. Những đặc trưng thường gặp nhất bao gồm: bất thường tim mạch (tứ chứng Fallot, hẹp động mạch phổi với thông liên thất, thân chung động mạch, thất phải hai đường ra, bất thường động mạch chủ), bất thường khuôn mặt (rãnh mí mắt ngắn, gốc mũi

to, mũi tẹt, cằm nhọn, hai tai thấp, tật đầu nhỏ), suy giảm miễn dịch, thiếu sản tuyến ức, hạ calci máu, bất thường thận, bất thường hệ vận động, rối loạn ngôn ngữ và khả năng học tập [5]. Ngoài ra, người bệnh cũng có nguy cơ cao mắc các bệnh tâm thần về sau này như tâm thần phân liệt, trầm cảm, hoặc mắc hội chứng tăng động giảm chú ý (ADHD) [3].

Hơn 90% HC DiGeorge là do mất đoạn nhỏ trên nhiễm sắc thể 22 vùng 22q11. Vùng mất đoạn chính có kích thước 300kb - 400kb chứa khoảng 20 - 30 gen nằm ở vị trí 22q11.2. Các nghiên cứu đã chỉ ra đột biến mất gen TBX1 - một gen mã hoá cho protein Tbox1 (là protein quan trọng cho sự hình thành của các mô và các cơ quan nhất định trong quá trình phát triển phôi thai) có thể gây ra nhiều dấu hiệu đặc trưng của HC DiGeorge (như dị tật tim, hở hàm ếch, đặc điểm bất thường khuôn mặt, giảm thính lực, hạ calci máu). Một số nghiên cứu khác cho rằng việc mất một gen khác, gen COMT cũng nằm trong vùng 22q11.2 có thể

gây ra các vấn đề về rối loạn hành vi và tâm thần của HC DiGeorge[3]. Sự mất mát các gen khác nhau, tương tác giữa các gen có thể là nguyên nhân gây nên các bất thường lâm sàng đa dạng của HC DiGeorge, không có sự tương quan giữa kích thước của đoạn bị mất với mức độ nặng nhẹ trên lâm sàng.

Một tỷ lệ rất nhỏ HC DiGeorge là do mất đoạn trên cánh ngắn nhiễm sắc thể số 10, vùng 10p13-14. Kích thước của vùng gen là 300kb có chứa gen DGS2 và BRUNOL3, được cho là gen gây nên dị tật tim, thiếu sản tuyến ức [1].

Cơ chế di truyền của HC DiGeorge tuân theo quy luật tính trạng trội trên nhiễm sắc thể thường. 90% bệnh nhân mất đoạn do tự phát, 10% mất đoạn do sự di truyền có tính chất gia đình [2].

Mất đoạn 22q11.2 trong HC DiGeorge là mất đoạn nhỏ, không phát hiện được trên công thức NST thông thường và khó phát hiện trên công thức NST có độ phân giải cao kéo dài băng. Hiện nay, có nhiều phương pháp xét nghiệm để chẩn đoán HC DiGeorge như: FISH, MLPA, microarray. Tuy nhiên, kỹ thuật FISH sử dụng đầu dò đặc hiệu cho vùng gen 22q11.2 vẫn là phương pháp hiệu quả, nhanh chóng, phát hiện trên 90% các trường hợp mắc HC DiGeorge, giúp đưa ra chẩn đoán chính xác HC này. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu:

*Áp dụng kỹ thuật FISH để phát hiện mất đoạn 22q11.2 trong HC DiGeorge*

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng và bệnh phẩm

154 bệnh nhân có các triệu chứng nghi ngờ mắc HC DiGeorge tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 01/2008 đến 07/2015.

Bệnh phẩm là máu ngoại vi vô trùng có chống đông bằng heparin. Tế bào máu ngoại vi được nuôi cấy trong môi trường RPMI (Gibco) với sự

có mặt của PHA (Gibco) nhằm kích thích sự phát triển của tế bào lympho T. Sau 72 giờ nuôi cấy, tế bào sẽ được thu hoạch, tạo tiêu bản. Cặn tế bào thu hoạch được sau khi nuôi cấy NST được sử dụng để làm interphase/metaphase FISH.

### 2.2. Phương pháp

Kỹ thuật FISH (Fluorescence in situ hybridization - lai huỳnh quang tại chỗ), được sử dụng để xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của một vùng NST nào đó thông qua việc gắn một cặp mồi DNA đã được đánh dấu huỳnh quang vào vùng NST cần được xác định.

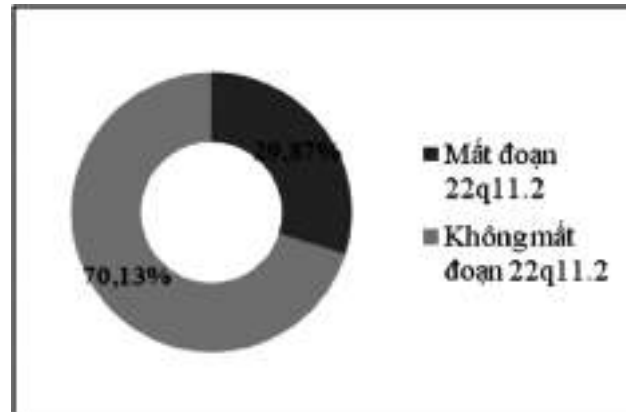
- Tạo tiêu bản: Cặn tế bào đã qua nuôi cấy được phun trên lam kính sạch, để khô. Tiêu bản được kiểm tra trên kính hiển vi soi ngược (Leica) để đánh giá mật độ tế bào trên vùng tiêu bản sẽ được tiếp xúc với đầu dò đặc hiệu. Số lượng yêu cầu khoảng 10-15 tế bào/vi trường, hoặc 1-2 cụm nhiễm sắc thể/vi trường.

- Lai đầu dò đặc hiệu: Sử dụng đầu dò D22S75 (N25) đánh dấu ở nhánh dài NST 22 đoạn 22q11.2 và đầu dò ARSA đánh dấu ở nhánh dài NST 22 đoạn 22q13 (Vysis) trong HC DiGeorge.

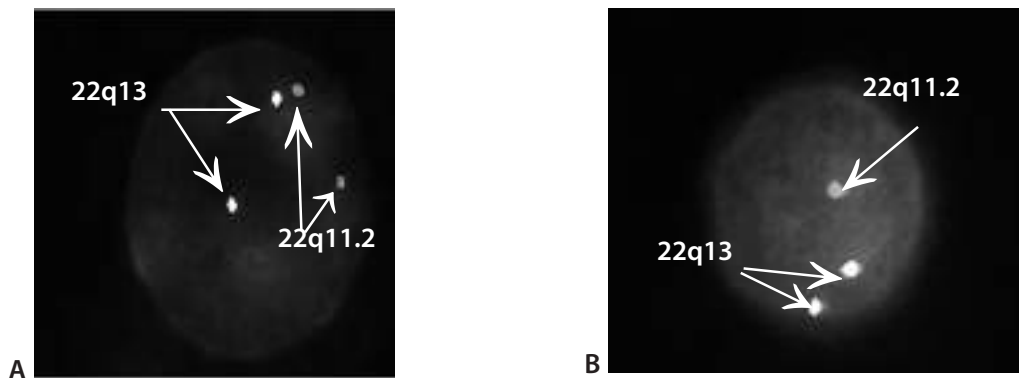
- Phân tích dưới hệ thống kính hiển vi huỳnh quang với phần mềm ISIS (Metasystem). Tiêu chuẩn phát hiện dựa vào các tín hiệu của đầu dò: Với đầu dò N25/ARSA cho NST 22, trong trường hợp không có bất thường NST, sẽ thể hiện 2 tín hiệu xanh là tín hiệu kiểm chứng cho NST 22 vùng 22q13, và 2 tín hiệu đỏ của vùng 22q11.2. Trong trường hợp mắc HC DiGeorge, sẽ thể hiện 2 tín hiệu xanh và chỉ có 1 tín hiệu đỏ do mất đoạn vùng 22q11.2 [1].

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sử dụng kỹ thuật FISH trên 154 bệnh nhân có nghi ngờ mắc HC DiGeorge phát hiện 29,8% bệnh nhân có mất đoạn 22q11.2 và 70,2% bệnh nhân không có mất đoạn 22q11.2.



Hình 1. Tỷ lệ bệnh nhân mắc hội chứng DiGeorge



Hình 2. Kết quả FISH

(A): NST 22 bình thường có 2 tín hiệu màu xanh thể hiện tín hiệu kiểm chứng vùng 22q13; 02 tín hiệu màu đỏ thể hiện không mất đoạn 22q11.2

(B): NST 22 trong HC DiGeorge có 2 tín hiệu màu xanh thể hiện tín hiệu kiểm chứng vùng 22q13; 01 tín hiệu màu đỏ thể hiện mất đoạn 22q11.2

Bảng 1. Tuổi, giới, triệu chứng lâm sàng của các bệnh nhân được khẳng định mắc HC DiGeorge

Giới	Nam	27/46 bệnh nhân	58,6%
	Nữ	19/46 bệnh nhân	41,3%
Tuổi	< 1 tháng	27/46 bệnh nhân	58,6%
	>1 tháng - 5 tuổi	19/46 bệnh nhân	41,4%
Triệu chứng lâm sàng	Bất thường tim mạch	30/46 bệnh nhân	60,8%
	Suy hô hấp/VPQP	12/46 bệnh nhân	26,08%
	Bất thường khuôn mặt	25/46 bệnh nhân	54,43%
	Hạ Ca máu	20/46 bệnh nhân	43,4%
	Suy giảm miễn dịch	2/46 bệnh nhân	4,3%
	Khác	5/46 bệnh nhân	10,8%

#### 4. BÀN LUẬN

HC DiGeorge là một trong những rối loạn di truyền do mất đoạn nhỏ trên NST thường gặp nhất [7].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, xét nghiệm FISH trên 154 bệnh nhân có nghi ngờ mắc HC Digeorge đã phát hiện 46 (29,8%) trường hợp bị mất đoạn 22q11.2. Trong đó, có 27/46 bệnh nhân (58,6%) là nam và 19/46 bệnh nhân (41,3%) là nữ, tỷ lệ này cho thấy không có sự khác biệt rõ ràng về giới với HC DiGeorge. Cho đến nay chưa có báo cáo nào thống kê về tỷ lệ nam/nữ mắc HC DiGeorge cũng như nghiên cứu ảnh hưởng của giới tính đến HC này.

HC DiGeorge có những biểu hiện lâm sàng ở những độ tuổi khác nhau. Có hai giai đoạn chính mà việc chẩn đoán HC DiGeorge thường được đưa ra là giai đoạn sơ sinh và sau đó. Hầu hết các bệnh nhân được chẩn đoán mắc HC DiGeorge ở giai đoạn sơ sinh đều có biểu hiện dị tật tim, khuôn mặt bất thường, hạ Ca máu, suy giảm miễn dịch. Các bệnh nhân được chẩn đoán sau giai đoạn sơ sinh thường có thêm các biểu hiện khác như nhiễm trùng tái phát, chậm phát triển, rối loạn ngôn ngữ và hành vi [4]. Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, trong 46 bệnh nhi có mất đoạn 22q11.2, có 27 (58,6%) là trẻ dưới 1 tháng tuổi và 19 (41,4%) là từ hơn 1 tháng đến 5 tuổi. 27 bệnh nhân sơ sinh mắc HC DiGeorge đều có triệu chứng lâm sàng liên quan đến bất thường tim mạch bẩm sinh, khe hở vòm miệng, hạ Ca máu, suy hô hấp. Các bệnh nhân sau giai đoạn sơ sinh từ hơn 1 tháng đến 5 tuổi đến khám và được chỉ định làm xét nghiệm FISH cho HC DiGeorgedo có thêm những biểu hiện lâm sàng như chậm phát triển tâm thần và vận động, bất thường về mắt, tai, rối loạn ngôn ngữ.

Triệu chứng lâm sàng của HC DiGeorge rất

đa dạng. Những bệnh nhân mắc HC DiGeorge có những biểu hiện lâm sàng khác nhau. Bất thường về tim mạch là một trong những dấu hiệu lâm sàng hay thấy nhất ở các bệnh nhân mắc HC DiGeorge. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 60,8% bệnh nhân mất đoạn 22q11.2 có biểu hiện dị tật tim bẩm sinh, trong đó thường gặp là tứ chứng Fallot, thất phải hai đường ra, thông liên thất, suy tim. Nghiên cứu của Donna M và cộng sự (2005) cũng đã báo cáo 74% cá thể bị mắc HC DiGeorge có bệnh tim bẩm sinh [6]. Theo nghiên cứu của bệnh viện Nhi Wisconsin (Mỹ) thì 80% bệnh nhân mắc HC DiGeorge bị dị tật tim [5].

Ngoài bất thường tim mạch, các bệnh nhân mắc HC DiGeorge có thể kèm theo các biểu hiện lâm sàng khác. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong 46 bệnh nhân bị mất đoạn 22q11.2 có 26,08% bệnh nhân có biểu hiện suy hô hấp/viêm phế quản phổi, 54,43% bệnh nhân có đặc điểm khuôn mặt bất thường (khe hở vòm miệng, tật đầu nhỏ), 43,4% bệnh nhân bị hạ Ca máu, 4,3% bệnh nhân có suy giảm miễn dịch và 10,8% bệnh nhân có các triệu chứng lâm sàng khác như chậm phát triển tâm thần, bất thường thận, tràn dịch màng phổi, rối loạn ngôn ngữ. Điều này cũng phù hợp với tỷ lệ các triệu chứng lâm sàng của HC DiGeorge được mô tả trong các nghiên cứu khác [5,6].

Kỹ thuật FISH chẩn đoán mất đoạn 22q11.2 thường được chỉ định để chẩn đoán xác định HC DiGeorge khi các bệnh nhân có các triệu chứng lâm sàng điển hình của HC này như bất thường tim mạch, khuôn mặt, suy giảm miễn dịch, chậm phát triển tâm thần và vận động. Hiện nay, kỹ thuật FISH vẫn được coi là kỹ thuật hiệu quả, nhanh chóng, chính xác trong chẩn đoán HC DiGeorge. Tuy nhiên, kỹ thuật này không chẩn đoán được một phần nhỏ các bệnh nhân mắc HC DiGeorge do mất đoạn trên cánh ngắn NST số 10 tại vùng p13-14.

## 5. KẾT LUẬN

- Áp dụng thành công kỹ thuật FISH trên 154 bệnh nhân nghi ngờ mắc HC DiGeorge, phát hiện 46 (29,8%) trường hợp mất đoạn 22q11.2 trong HC DiGeorge.

- Kỹ thuật FISH là phương pháp hiệu quả, chính xác, nhanh chóng trong chẩn đoán xác định HC DiGeorge.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đinh Thị Hồng Nhung (2009). Áp dụng kỹ thuật FISH trong chẩn đoán các bệnh di truyền. Luận văn thạc sĩ khoa học.

2. 22q11 Deletion Disorder: DiGeorge and Velocardiofacial Syndrome (2015). American Heart Association.

3. 22q11.2 deletion syndrome (2012). Genetics Home Reference, U.S National Library of Medicine.

4. Information about the 22q11.2 Deletion, Velocardiofacial Syndrome and DiGeorge Syndrome (2009). Upper Midwest VCFS/DGS community, University of Minnesota Foundation, USA.

5. DiGeorge syndrome. Children Hospital of Wisconsin. USA.

6. Donna M McDonald-McGinn, MS, CGC, Beverly S Emanuel, PhD, Elaine H Zackai, MD, FACMG (2005). 22q11.2 Deletion Syndrome. GeneReviews.

7. Sintia Iole Nogueira Belangero; Fernanda T.S. Bellucco; Leslie Domenici Kulikowski; Denise M. Christofolini; Mirlene C. S. P. Cernach; Maria Isabel Melaragno (2009). 22q11.2 deletion in patients with conotruncal heart defect and del22q syndrome phenotype. Arq. Bras. Cardiol. vol.92 no.4.

## ABSTRACT

### APPLY FISH TECHNIQUE TO DIAGNOSE DIGEORGE SYNDROME

DiGeorge syndrome (DGS) is a genetic disorder whose symptoms vary greatly between individuals but commonly include congenital heart disease, characteristic facial features, hypocalcemia, and immune deficiency. 90% of the cases of DGS are caused deletion occurs on the q arm of chromosome 22 at 22q11.2. DGS is estimated to affect at least one in 4.000 live births. **Objective:** To detect the deletion at 22q11.2 by FISH technique. **Material and Method:** 154 patients were suspected DGS. Apply FISH technique with D22S75 (N25) special probe to detect deletion at 22q11.2. **Result:** 46/154 (29,8%) patients have deletion at 22q11.2 to diagnose DGS. **Conclusion:** FISH technique is accurate, fast method to diagnose DGS.