

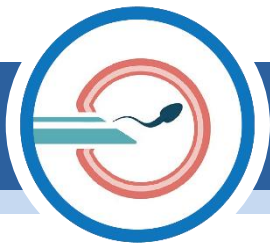
GIẢI PHÁP DI TRUYỀN CHO HỖ TRỢ SINH SẢN **PGT-A & PGT-M**



GS.TS Nguyễn Đình Tảo

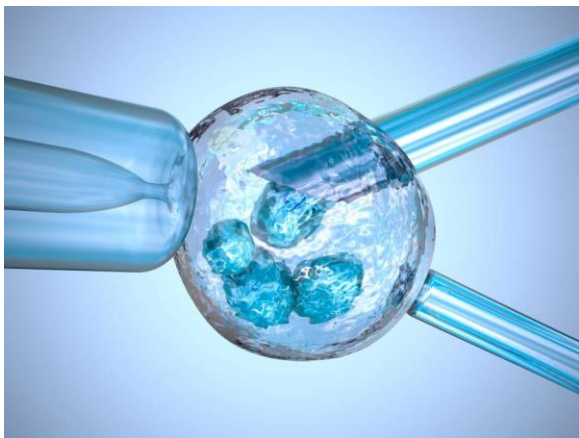
Chủ tịch Hội hỗ trợ sinh sản Hà Nội

GD TT Hỗ trợ sinh sản BV Đa khoa 16A



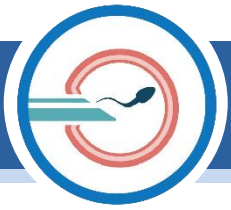
NỘI DUNG

❖ **Thụ tinh
trong ống nghiệm**

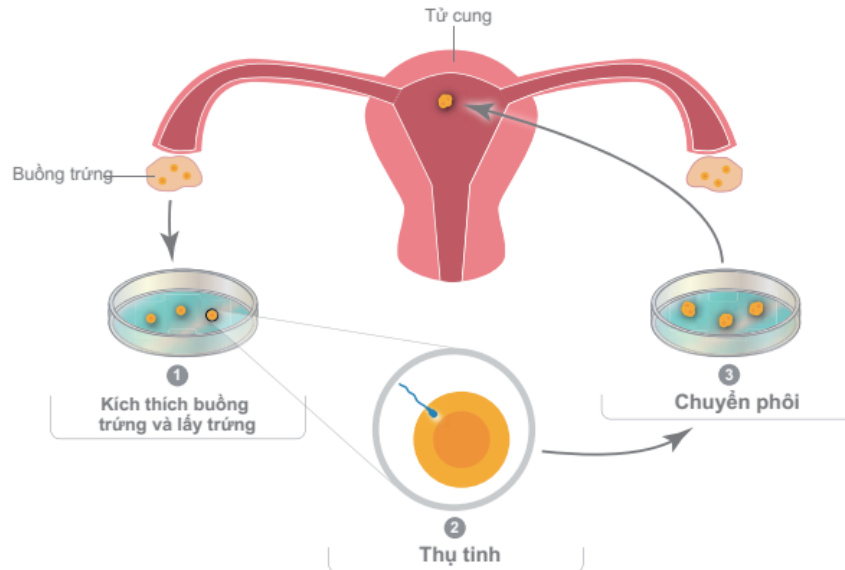


❖ **Ứng dụng PGT-A:**
Sàng lọc di truyền
trước chuyển phôi

❖ **Ứng dụng PGT-M:**
Chẩn đoán di truyền
trước chuyển phôi



IVF THƯỜNG QUY



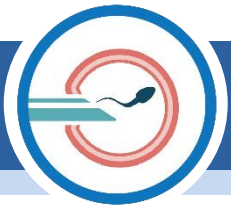
3 bước chính trong chu trình IVF:



THÁCH THỨC:

ĐA THAI

TỈ LỆ ĐẬU THAI

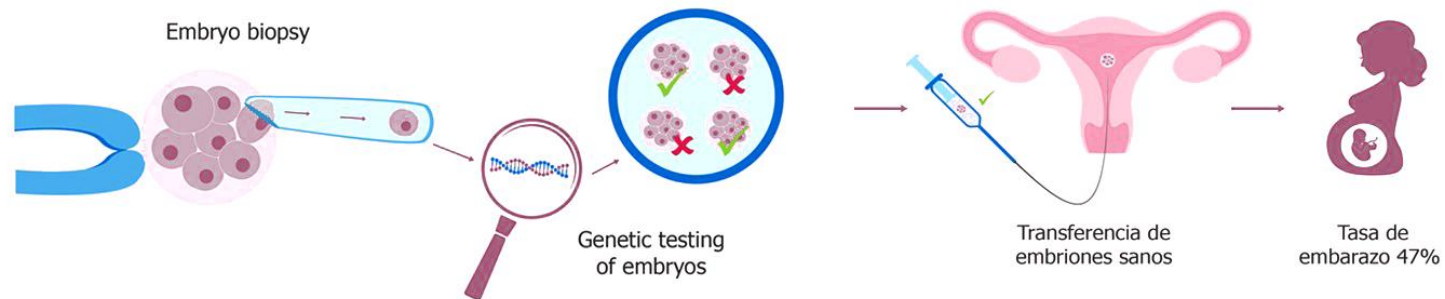


PGT - A (PGS)

Là xét nghiệm sàng lọc xác định bất thường số lượng NST và các bất thường cấu trúc lớn (mất đoạn, thêm đoạn)

Mục đích:

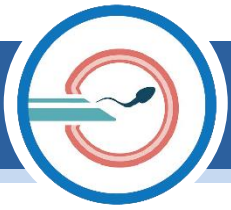
- Giúp chọn lựa ra những phôi có chất lượng, khỏe mạnh chuyển vào tử cung của mẹ trong quá trình IVF



Chuyển phôi
thành công

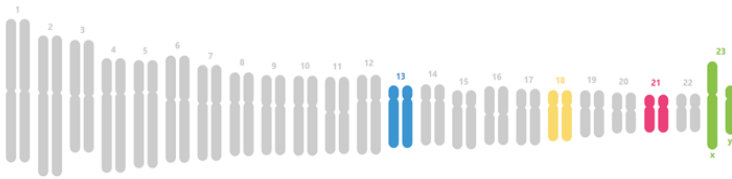


Sảy thai sau
khi làm IVF

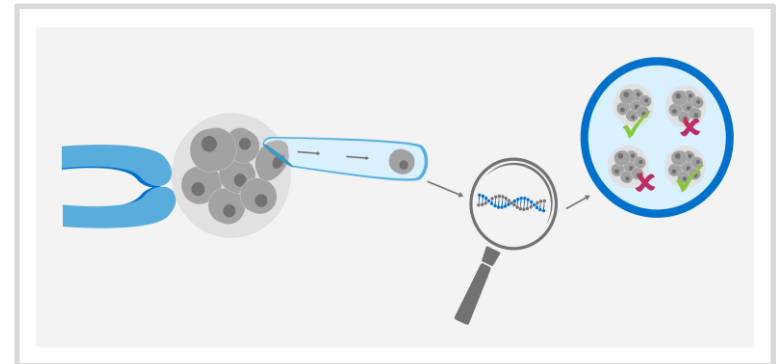


PGT – A

- Xác định bất thường số lượng NST, thể khảm



**Chọn lựa ra các phôi bào
Không mang bất thường
cho quá trình chuyển phôi**



QUY TRÌNH PHÂN TÍCH MẪU

Sử dụng quy trình theo bộ kit VeriSeq PGS - Illumina.

Khuếch đại ADN

Khuếch ADN từ 1 tế bào
(Ngày 3) hoặc nhiều tế bào
(Ngày 5) bằng bộ kit
SurePlex – WGA



• Tổng 4.5 giờ

Tạo thư viện và gắn Index cho các mẫu

Các mẫu ADN được cắt nhỏ
và gắn Index để phân biệt
giữa các mẫu (24 mẫu).



• Tổng 4.5 giờ

Đọc trình tự các đoạn ADN bằng máy MiSeq

Có thể đọc tới 24 mẫu trong 1
lần chạy. Mỗi đoạn ADN được
đọc hàng nghìn lần.



• Tổng 4 - 5.5 giờ

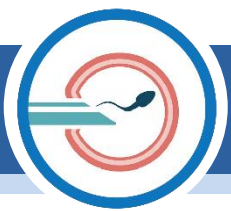
Phân tích kết quả

Kết quả trình tự đọc từ máy
MiSeq được đưa vào phần
mềm BlueFuse để phân tích



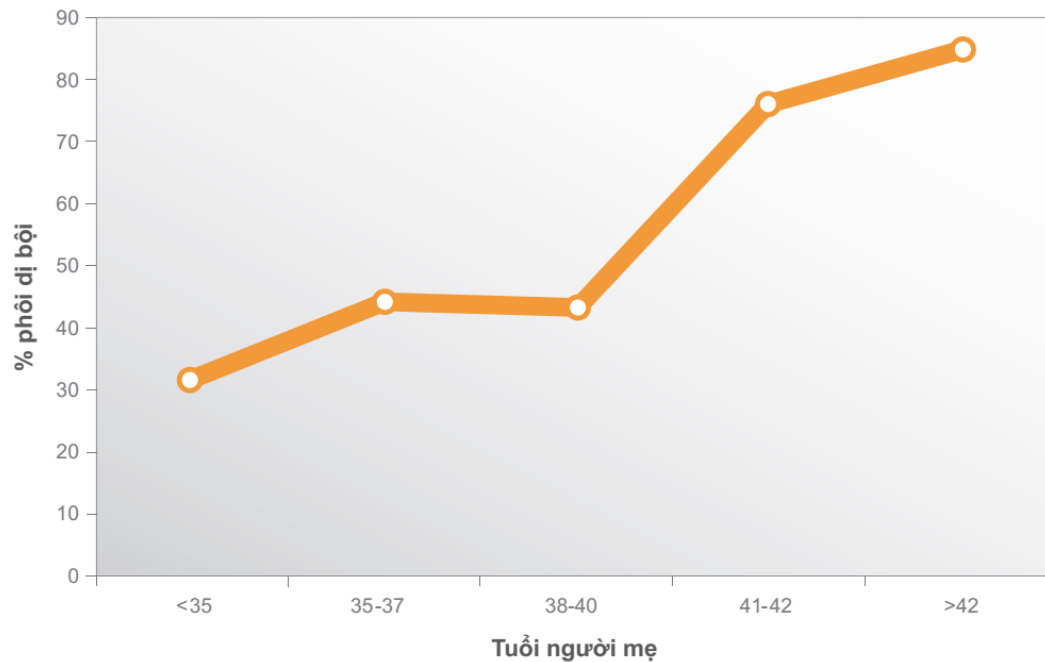
• Tổng 10 phút

* Thông tin từ Trung tâm xét nghiệm di truyền GENTIS

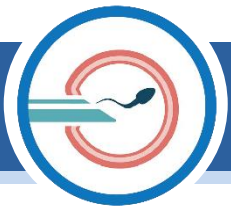


SỬ DỤNG PGT-A

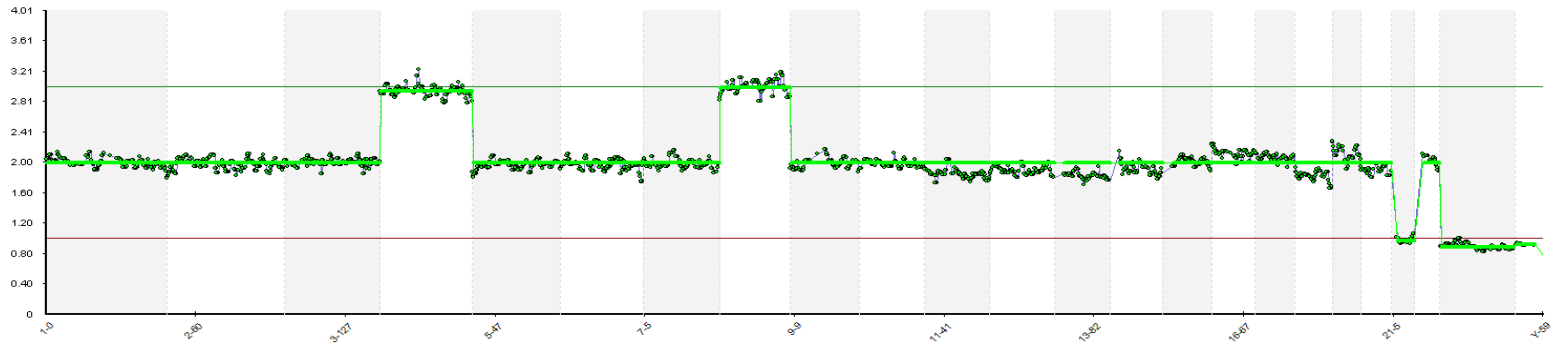
- ❖ PGT-A phù hợp với đại đa số trường hợp IVF.
- ❖ Tất cả phụ nữ có nguy cơ tạo phôi bất thường nhiễm sắc thể: Khi phụ nữ có tuổi, khả năng phôi bất thường nhiễm sắc thể tăng
- ❖ PGT-A có thể giúp TĂNG cơ hội mang thai thành công.



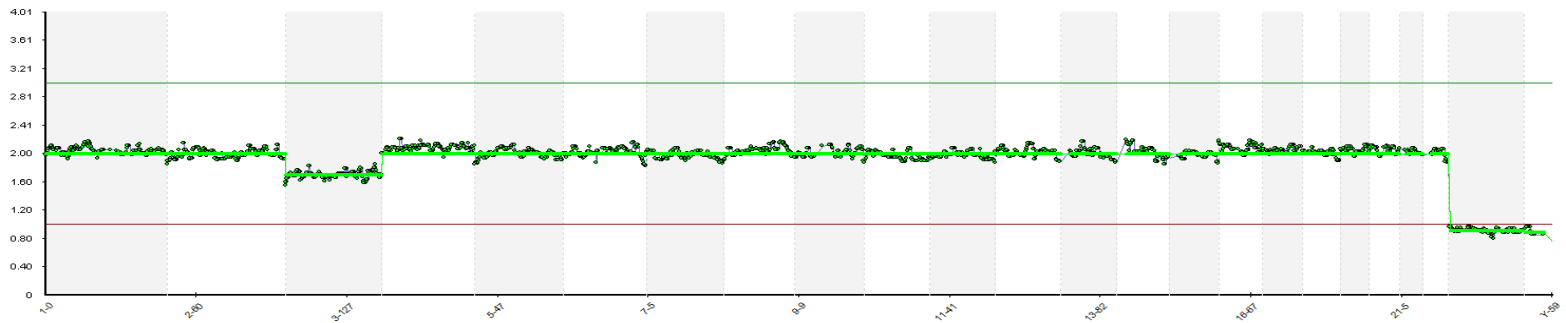
Harton GL, et al. *Fertil Steril*. 2013;100(6):1695-1703.
Scott RT Jr, et al. *Fertil Steril*. 2012;97(4):870-875.



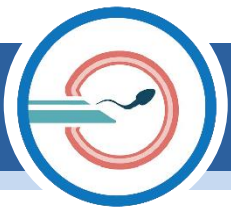
PGT-A – PHÁT HIỆN BẤT THƯỜNG NST



Bất thường lệch bội ở phôi ngày 5



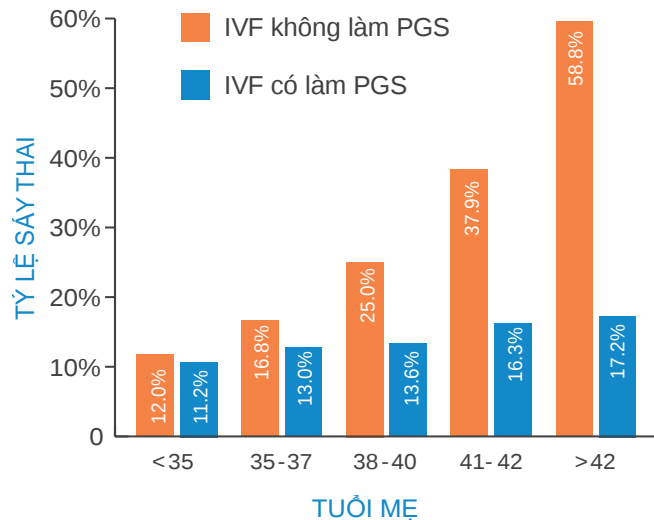
Phát hiện khảm lệch bội ở phôi ngày 5



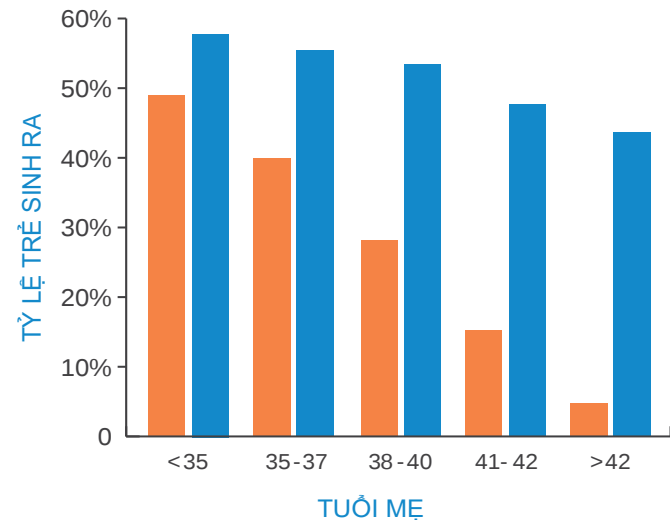
PGT - A (PGS)

- PGT - A (PGS) đã được chứng minh giúp tăng tỷ lệ làm tổ thành công, giảm tỷ lệ sảy thai và tăng tỉ lệ trẻ được sinh ra bình thường.

PGS giảm tỷ lệ sảy thai



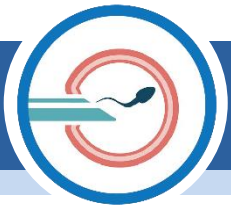
PGS tăng tỷ lệ trẻ sinh sống



- PGT - A (PGS) cũng cho phép chuyển phôi chính xác hơn, giảm tỉ lệ đa thai

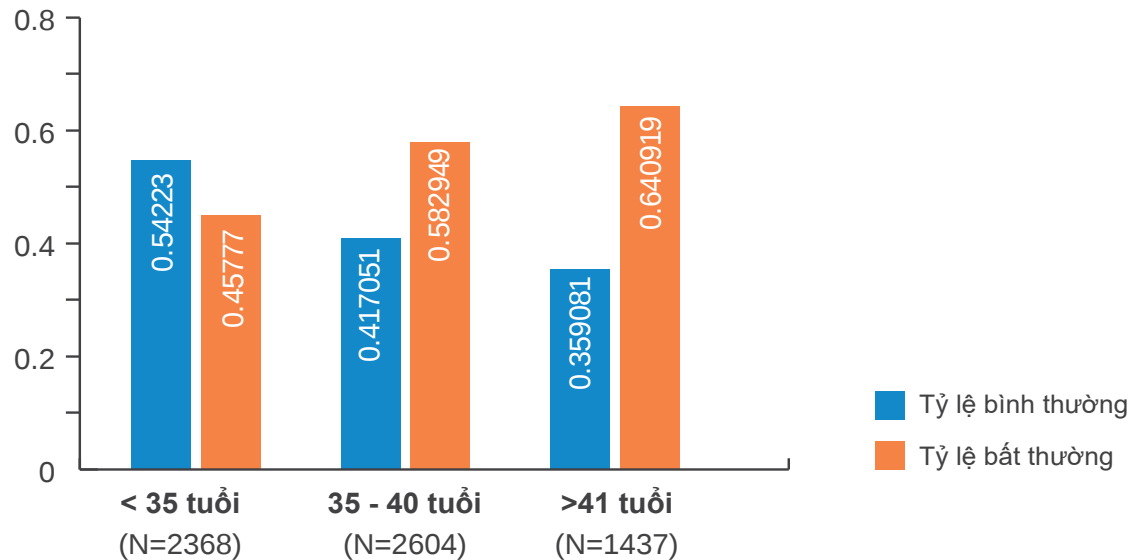
SỐ LƯỢNG MẪU (SỐ LẦN CHUYỂN PHÔI)					
Tuổi mẹ	<35	35-37	38-40	41- 42	>42
IVF không làm PGS	29.989	13.144	10.497	4.678	3.009
IVF có làm PGS	5.326	3.366	2.941	973	243

- SART.Org data (2015) -

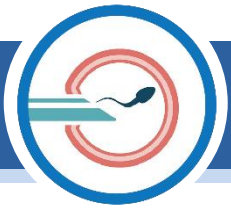


TỈ LỆ BÌNH THƯỜNG, BẤT THƯỜNG THEO ĐỘ TUỔI*

- Tất cả những bệnh nhân IVF đều có nguy cơ tạo ra những phôi mang bất thường NST.
- ***Khi tuổi mẹ càng cao, tỷ lệ phôi mang bất thường NST càng tăng.***



* Dữ liệu từ GENTIS (2017-2018)

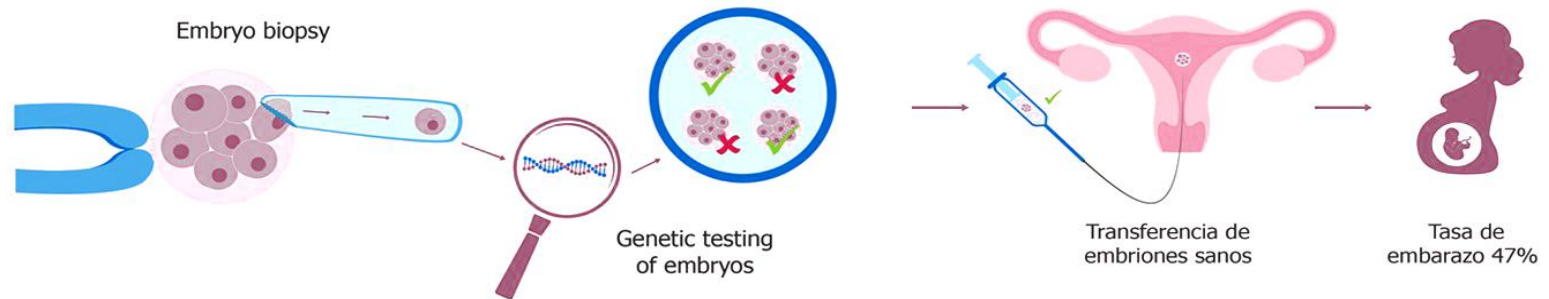


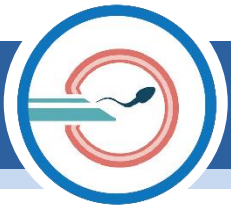
PGT - M (PGD)

Là xét nghiệm phát hiện các đột biến di truyền gây bệnh ở phôi được di truyền từ bố hoặc mẹ hoặc cả bố và mẹ

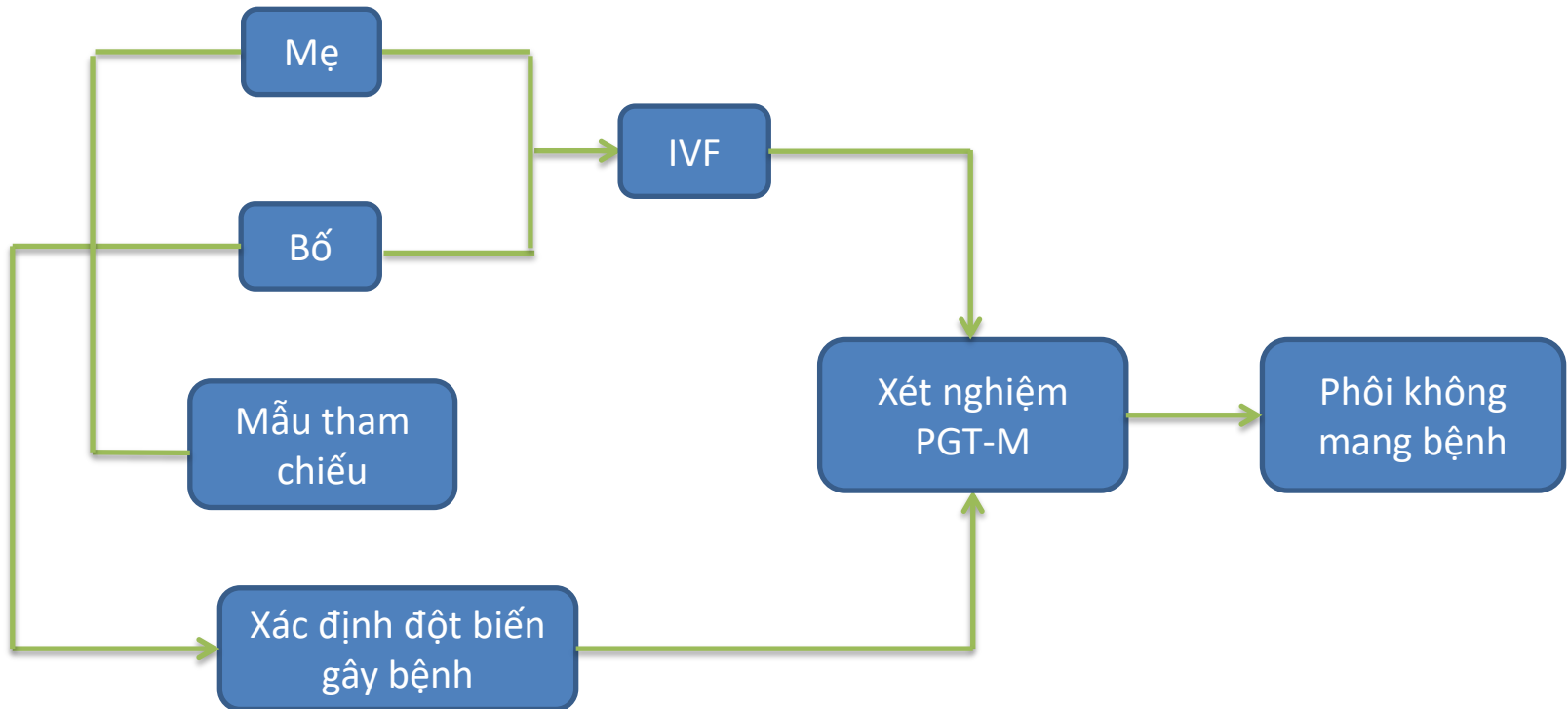
Mục đích:

- Giúp chọn lựa ra những phôi không mắc bệnh di truyền cho quá trình chuyển phôi



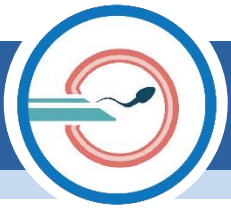


QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM PGT-M



Bước 1: Phát hiện đột biến của bố, mẹ, con (nếu có)

Bước 2: Thực hiện chẩn đoán gen bệnh trên phôi.



Đặc điểm xét nghiệm PGT - M

- Lượng DNA ban đầu rất nhỏ (một hoặc một vài tế bào phôi)

⇒ Đòi hỏi quá trình khuếch đại toàn hệ gen (Whole genome amplification – WGA)

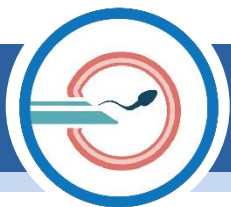
- Sản phẩm WGA có các giới hạn:

- Kích thước ngắn (dưới 2kb)

- Hiện tượng allen-drop out cao => đưa ra kết luận sai

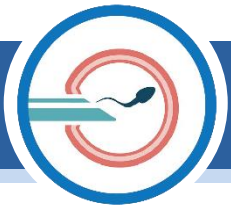
⇒ Không thể sử dụng các kỹ thuật và phương pháp thông thường đối với mẫu gDNA

⇒ Cần mẫu tham chiếu để loại trừ khả năng kết luận sai do allen-dropout



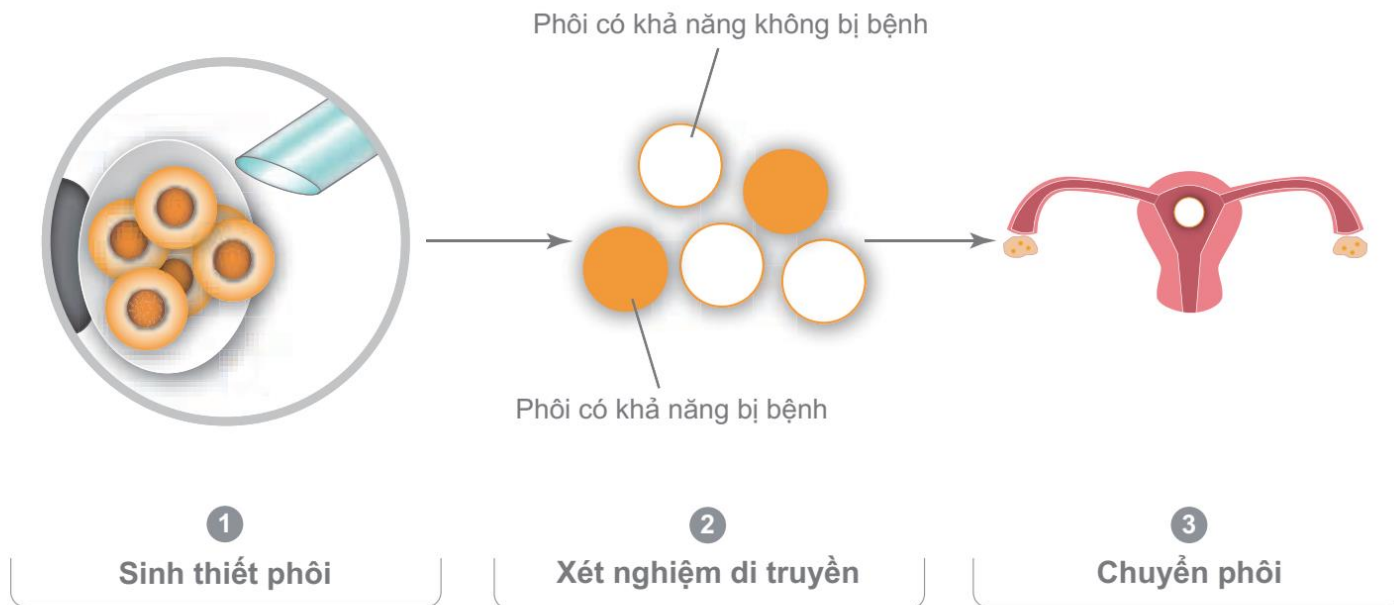
Các cách tiếp cận cho PGT - M

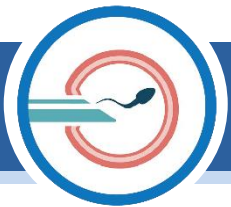
STT	Kỹ thuật	Ưu điểm	Nhược điểm
1	Sử dụng STR	- Dễ tối ưu quy trình, độ đa hình cao - Kết hợp được với xét nghiệm PGT-A - Chi phí thấp	- Phụ thuộc vào độ phân bố của STR trong hệ gen - Khả năng xảy ra đột biến cao - Stutter - Cần tối ưu các panel riêng cho từng bệnh - Bị ảnh hưởng bởi allel drop-out
2	Karyomapping	- Sử dụng chung được cho nhiều bệnh - Lượng SNP sử dụng rất lớn nên rất ít bị ảnh hưởng bởi allel drop-out	- Không kết hợp được với xét nghiệm PGT-A - Chi phí cao
3	Sử dụng SNP	- Dễ tối ưu quy trình, độ đa hình cao - Kết hợp được với xét nghiệm PGT-A - SNP phân bố đồng đều và phổ biến trong hệ gen nên dễ chọn lựa và sử dụng - Chi phí thấp	- Cần tối ưu các panel riêng cho từng bệnh - Bị ảnh hưởng rất lớn bởi allel drop-out



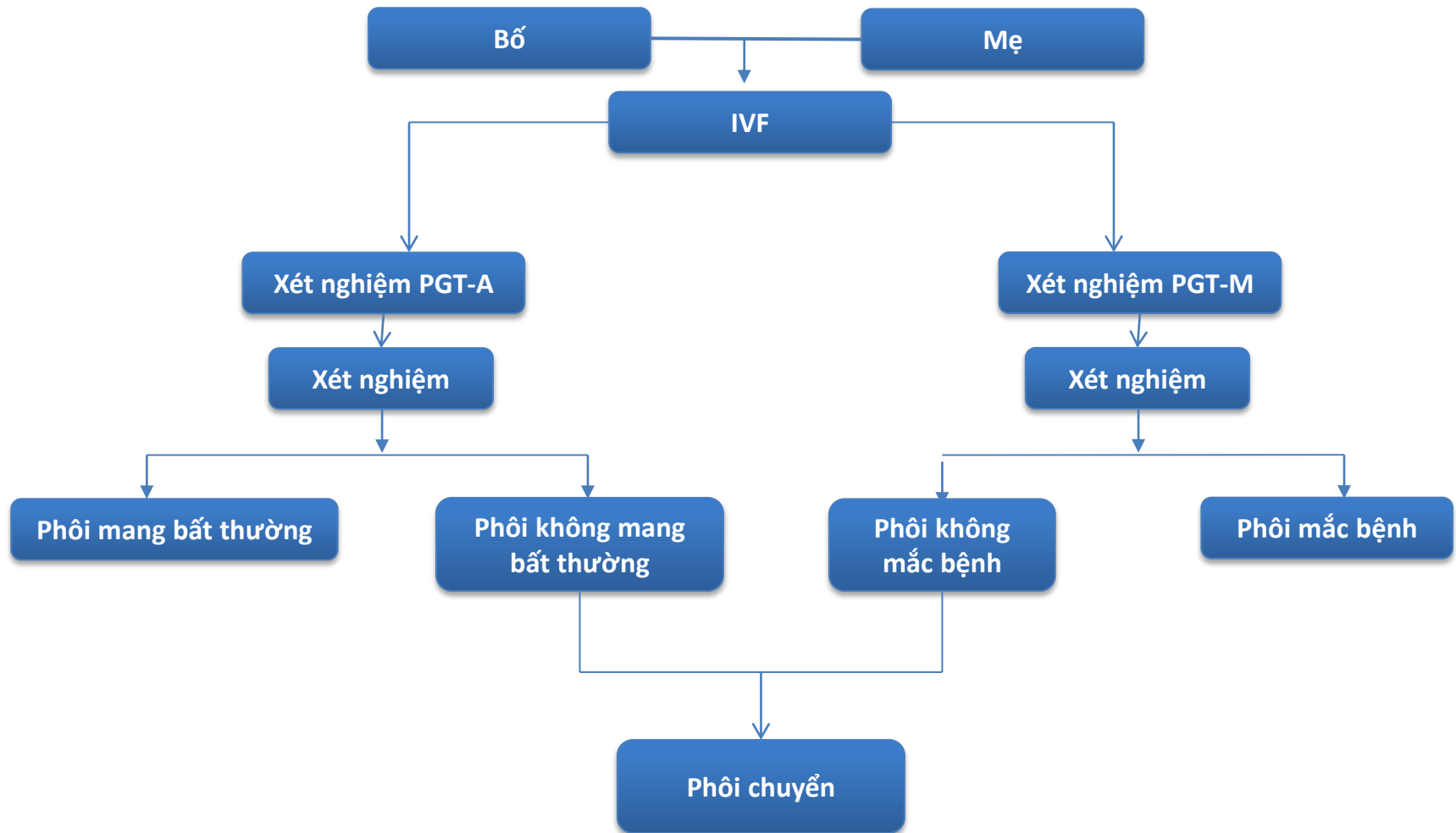
Kết hợp xét nghiệm PGT - A và PGT - M

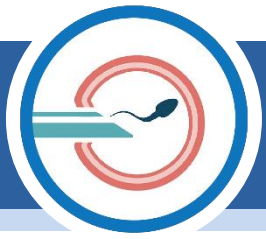
Là xét nghiệm kết hợp **PGT - A /PGT - M** phát hiện các phôi không mang đột biến di truyền gây bệnh (di truyền từ bố hoặc mẹ hoặc cả bố và mẹ) và không mang bất thường lệch bội nhiễm sắc thể





Kết hợp xét nghiệm PGT - A (PGS) và PGT - M (PGD)



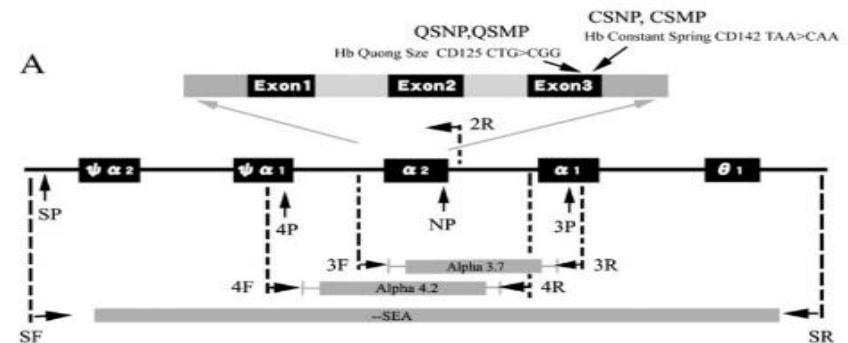
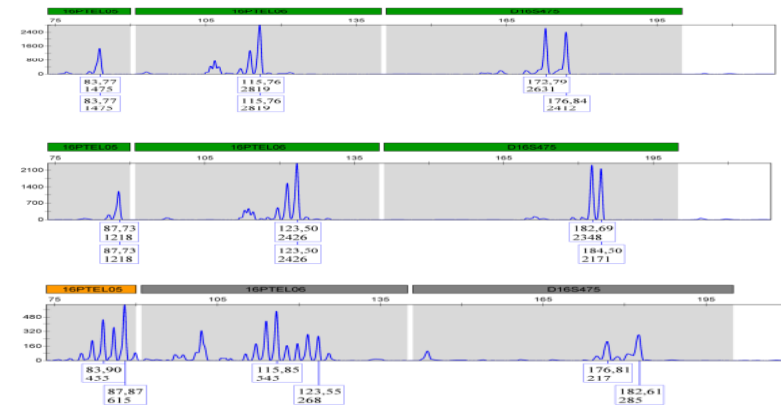


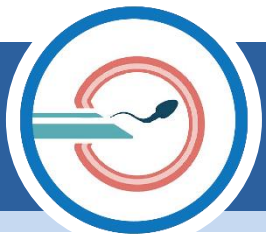
Một số xét nghiệm PGT-M phổ biến

Alpha-thalassemia

- Đột biến gây bệnh alpha-thalassemia bao gồm đột biến mất đoạn và đột biến điểm
- Phương pháp: GAP-PCR/giải trình tự Sanger kết hợp phân tích di truyền liên kết sử dụng STR

=> Xác định đột biến đích đồng thời phát hiện allele drop-out



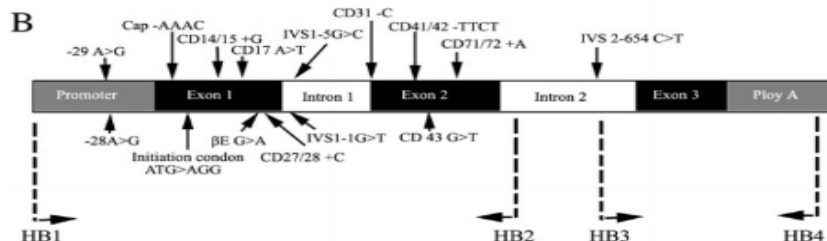


Một số xét nghiệm PGT-M phổ biến

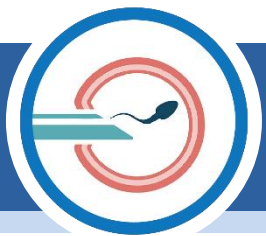
Beta-thalassemia

- Đột biến gây bệnh beta-thalassemia chủ yếu là các đột biến điểm
- Phương pháp: Giải trình tự vùng mã hóa gen HBB kết hợp phân tích di truyền liên kết sử dụng SNP

=> Xác định đột biến đích đồng thời phát hiện allele drop-out



Mẹ:								
#	Sample ID	Sample Name	Chr	Position	Score	Variant Type	Call	Frequency
1	THA18-0148	HN-00053	KR028331.1	398	40709	SNP	A->[A/G]	0.38
Bố:								
#	Sample ID	Sample Name	Chr	Position	Score	Variant Type	Call	Frequency
1	THA18-0149	HN-00053	KR028331.1	484	37007	SNP	T->[T/C]	0.37
2	THA18-0149	HN-00053	KR028331.1	527	51110	SNP	A->[A/T]	0.44
3	THA18-0149	HN-00053	KR028331.1	936	31574	SNP	G->[G/C]	0.35
4	THA18-0149	HN-00053	KR028331.1	994	111744	SNP	T->[T/G]	0.68
5	THA18-0149	HN-00053	KR028331.1	1586	34123	SNP	C->[C/T]	0.41
Anh trai:								
#	Sample ID	Sample Name	Chr	Position	Score	Variant Type	Call	Frequency
1	THA18-0150	HN-00053	KR028331.1	398	50472	SNP	A->[A/G]	0.36
2	THA18-0150	HN-00053	KR028331.1	527	68255	SNP	A->[A/T]	0.46
HNH2-P2:								
#	Sample ID	Sample Name	Chr	Position	Score	Variant Type	Call	Frequency
1	P2	HN-00053	KR028331.1	398	766	SNP	A->[A/G]	0.45
2	P2	HN-00053	KR028331.1	527	557	SNP	A->[A/T]	0.28



Một số xét nghiệm PGT-M phổ biến

Máu khó đông (Hemophilia)

- Máu khó đông là bệnh liên kết với NST giới tính X do đột biến gây bệnh chủ yếu là đột biến trên gen F8 và gen F9 nằm trên NST X

=> Kích thước gen đích lớn, sơ lượng đột biến gây bệnh lớn

=> Phương pháp: phân tích di truyền liên kết sử dụng SNP

Mẹ (Hiên):

Sample ID	Sample Name	Chr	Position	Score	Variant Type	Call	Frequency
HA-HIEN-ME	HA-HIEN-ME	NC_000023.11	154794371	13990	SNP	A->[A/T]	0.44
HA-HIEN-ME	HA-HIEN-ME	NC_000023.11	154794543	21138	SNP	C->[C/A]	0.50
HA-HIEN-ME	HA-HIEN-ME	NC_000023.11	154794602	12079	SNP	T->[T/C]	0.34
HA-HIEN-ME	HA-HIEN-ME	NC_000023.11	154794677	13568	SNP	G->[G/T]	0.38
HA-HIEN-ME	HA-HIEN-ME	NC_000023.11	154969895	38362	SNP	G->[G/C]	0.44
HA-HIEN-ME	HA-HIEN-ME	NC_000023.11	155045915	1628	SNP	A->[A/G]	0.24
HA-HIEN-ME	HA-HIEN-ME	NC_000023.11	155045933	4749	SNP	T->[T/C]	0.40

Cậu (Ưu) – mắc bệnh hemophilia:

Sample ID	Sample Name	Chr	Position	Score	Variant Type	Call	Frequency
HA-UA-CAU	HA-UA-CAU	NC_000023.11	154794543	19587	SNP	C->[A/A]	1.00
HA-UA-CAU	HA-UA-CAU	NC_000023.11	154794602	14496	SNP	T->[C/C]	1.00
HA-UA-CAU	HA-UA-CAU	NC_000023.11	154969895	48570	SNP	G->[C/C]	1.00
HA-UA-CAU	HA-UA-CAU	NC_000023.11	155045915	2645	SNP	A->[G/G]	1.00
HA-UA-CAU	HA-UA-CAU	NC_000023.11	155045933	3326	SNP	T->[C/C]	1.00

Hi1

Sample ID	Sample Name	Chr	Position	Score	Variant Type	Call	Frequency
PSTW-HI1	PSTW-HI1	NC_000023.11	154794543	52905	SNP	C->[A/A]	1.00
PSTW-HI1	PSTW-HI1	NC_000023.11	154794602	37569	SNP	T->[C/C]	1.00
PSTW-HI1	PSTW-HI1	NC_000023.11	154969895	194496	SNP	G->[C/C]	1.00
PSTW-HI1	PSTW-HI1	NC_000023.11	155045915	367	SNP	A->[G/G]	1.00
PSTW-HI1	PSTW-HI1	NC_000023.11	155045933	400	SNP	T->[T/C]	0.92

NÂNG CAO CHẤT LƯỢNG PHÔI CHUYỂN VÀ SINH RA NHỮNG EM BÉ KHỎE MẠNH





XIN CHÂN THÀNH CẢM ƠN!