

## Research Paper

# The Role of SNAP II in Neonatal Mortality Prognosis in the Intensive Care Unit at Haiphong Children's Hospital in 2020

Vu Dinh Quang\*, Tran Thi Nga, Le Thi Lieu, An Thuy Lan,  
Hoang Thi Thanh Moc, Dinh Thi Hong Nhung, Nguyen Xuan Huy,  
Ngo Thi Bich Ngoc, Tran Thi Huyen, Ngo Diem Ngoc

*Vietnam National Children's Hospital, 18/879 La Thanh, Dong Da, Hanoi, Vietnam*

Received 10 January 2022

Revised 15 January 2022; Accepted 15 February 2022

## Abstract

Chromosomal marker, a type of structural abnormal, is a small supernumerary marker chromosome which cannot be identified using conventional chromosome banding. The evaluation of marker's origin plays an important role in treatment and prognosis of patient.

**Objective:** Application of fluorescent in-situ hybridization technique in determining the origin of chromosomal marker.

**Method:** The fluorescent in-situ hybridization technique (FISH) using dual colours probe for chromosome X and Y to characterize the marker was carried out on the patient(s) found marker(s) in G-banding karyotype in 2020.

**Result:** In series of 3103 patients for whom cytogenetic analysis was requested in 2020, five cases with marker were identified. Three markers were mosaic, and two were nonmosaic. The FISH results verify three markers derived from chromosome Y and the others derived from chromosome X. Moreover, the FISH technique gives an accurate number and ratio clones in mosaicism. Those conclusions had been used in treatment protocol for patients.

**Conclusion:** The FISH technique is a reliable tool for determining the origin of chromosomal marker which used in treatment and prognosis for patient.

*Keywords:* fluorescent in-situ hybridization technique, Chromosomal marker, mosaicism

---

\* Corresponding author.

E-mail address: quangvu@nch.org.vn

<https://doi.org/10.47973/jprp.v6i2.389>

# Vai trò của thang điểm SNAPII trong tiên lượng tử vong sơ sinh tại Khoa Hồi sức Cấp cứu Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng năm 2020

Vũ Đình Quang\*, Trần Thị Nga, Lê Thị Liễu, An Thùy Lan, Hoàng Thị Thanh Mộc, Đinh Thị Hồng Nhung, Nguyễn Xuân Huy, Ngô Thị Bích Ngọc, Trần Thị Huyền, Ngô Diễm Ngọc

*Bệnh viện Nhi Trung ương, 18/879 La Thành, Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 10 tháng 1 năm 2022

Chỉnh sửa ngày 15 tháng 1 năm 2022; Chấp nhận đăng ngày 15 tháng 2 năm 2022

## Tóm tắt

Marker nhiễm sắc thể là một dạng bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể hiếm gặp. Đây là một mảnh nhỏ chất nhiễm sắc không xác định được bằng các kỹ thuật nhuộm băng thông thường. Việc xác định nguồn gốc marker có vai trò quan trọng trong chẩn đoán, định hướng điều trị, tiên lượng của bệnh nhân và phòng bệnh.

**Mục tiêu:** Xác định nguồn gốc các marker bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ.

**Phương pháp:** kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ sử dụng đầu dò 2 màu của hãng Abbott đánh dấu vào nhiễm sắc thể X và Y trên tiêu bản cặn tế bào sau nuôi cấy và thu hoạch trên các bệnh nhân có marker nhiễm sắc thể trên công thức nhiễm sắc thể trong năm 2020 tại khoa Di truyền và Sinh học Phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương.

**Kết quả:** Trong số 3.103 bệnh nhân có chỉ định phân tích công thức nhiễm sắc thể năm 2020, có 05 trường hợp phát hiện marker sau khi phân tích nhiễm sắc thể đồ. Xét nghiệm lai huỳnh quang tại chỗ cho thấy 03 marker có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể Y, 02 marker còn lại có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể X. Ngoài ra, kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ còn cho phép xác định chính xác số lượng và tỉ lệ các dòng tế bào khác nhau trên bệnh nhân thể khảm. Các kết quả này đều được sử dụng trong điều trị bệnh nhân tại Bệnh viện Nhi Trung ương.

**Kết luận:** Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ là một công cụ tin cậy trong việc cung cấp thêm thông tin di truyền về nguồn gốc các marker chưa rõ nguồn gốc, góp phần trong chẩn đoán, điều trị và tiên lượng bệnh cho bệnh nhân.

*Từ khóa:* kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ, marker nhiễm sắc thể, thể khảm

## I. Tổng quan

Marker nhiễm sắc thể được định nghĩa là một phần nhỏ chất nhiễm sắc thừa ra (small

supernumerary marker chromosome) nhưng không thể xác định được nguồn gốc bằng các kỹ thuật nhuộm băng nhiễm sắc thể thông thường. Các thay đổi này được xếp vào nhóm bất thường về cấu trúc nhiễm sắc thể [5-6]. Các marker nhiễm sắc thể (sau đây được gọi là marker) thường có kích thước nhỏ hơn

\* Tác giả liên hệ

E-mail address: quangvu@nch.org.vn

<https://doi.org/10.47973/jprp.v6i2.389>

hoặc bằng nhiễm sắc thể số 20, và cần phải sử dụng các kỹ thuật di truyền phân tử tế bào để xác định nguồn gốc bất thường [2]. Tỷ lệ gặp marker khi chẩn đoán trước sinh là 1:1340 và sau sinh là 1:2250. Sự khác biệt giữa 2 tỷ lệ này do hai nguyên nhân chính: xảy thai tự nhiên và quyết định dừng thai ở các thai mang marker bất thường [10]. Khoảng 77% marker mới phát sinh trong thời kỳ hình thành và phát triển phôi, còn lại 23% có tính chất gia đình, ở đó 16% có nguồn gốc từ mẹ và 7% có nguồn gốc từ bố [2,7].

Phần lớn marker xuất phát từ các nhiễm sắc thể tâm mút (chiếm tỷ lệ khoảng 70%), trong đó thường gặp nhất là từ nhiễm sắc thể tâm mút khác là 23,8%. Marker xuất phát từ các nhiễm sắc thể thường còn lại ít gặp hơn và chiếm tỷ lệ khoảng 15% [7].

Việc xác định nguồn gốc của marker có ý nghĩa lâm sàng quan trọng. Ví dụ, marker mang tâm động và một phần cánh ngắn nhiễm sắc thể 15 thường có tính chất gia đình và có tiên lượng tốt. Ngược lại, nếu marker chứa vùng Prader-Willi/Angelman trên nhiễm sắc thể 15 thì lại có tiên lượng kém. Hay khi marker xuất hiện cùng công thức nhiễm sắc thể 45,X có thể bệnh nhân có kiểu hình hội chứng Turner hoặc rối loạn phát triển tuyến sinh dục nhưng cũng có thể có kiểu hình bình thường [10].

Tại Bệnh viện Nhi Trung ương, xét nghiệm phân tích công thức nhiễm sắc thể bằng nhuộm băng G từ máu ngoại vi là một trong những bước quan trọng để chẩn đoán chính xác bệnh tật cho bệnh nhân. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, xét nghiệm này là chưa thể đưa đến kết luận chính xác và đầy đủ, đặc biệt là các trường hợp phát hiện thấy marker trong bộ nhiễm sắc thể. Để đáp ứng yêu cầu làm rõ các bất thường này từ các nhà lâm

sàng, chúng tôi thực hiện nghiên cứu “Ứng dụng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ trong xác định nguồn gốc marker nhiễm sắc thể” nhằm xác định nguồn gốc các bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể này, từ đó đưa ra kết luận chính xác về bộ máy di truyền để có phác đồ điều trị phù hợp cho bệnh nhân.

## II. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu:

Các bệnh nhi dưới 18 tuổi, có chẩn đoán bất thường về các bệnh lý di truyền đến khám và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 1 đến tháng 12 năm 2020.

Sau khi phát hiện marker trong nhiễm sắc thể đồ bằng kỹ thuật nhuộm băng G thì thực hiện tiếp kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ để xác định nguồn gốc bất thường.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Mẫu bệnh phẩm

Cặn tế bào lưu trữ ở 4°C sau khi nuôi cấy và thu hoạch.

Mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân được thu thập vô trùng vào ống chân không chống đông heparin và bảo quản tại 4°C đến thời điểm nuôi cấy. Mỗi mẫu bệnh phẩm được nuôi cấy trong môi trường gồm 6,5mL RPMI + 1,5mL FBS + 100μL Phytohaemagglutinin và 600μL máu của bệnh nhân. Mẫu bệnh phẩm được nuôi cấy 72h, và được bổ sung 100μL colcemid để dừng tế bào tại kỳ giữa trước thời điểm thu hoạch 90 phút. Các tế bào ở kỳ giữa tiếp tục được xử lý với dung dịch nhuộm tương và dung dịch Carnoy (3 thể tích Methanol: 1 thể tích Acid Acetic).

Đánh dấu 1 vùng kích thước khoảng 18x18mm bằng bút kim cương trên tiêu bản SuperFrost. Nhỏ 10μl cặn tế bào lên vùng đánh dấu, kiểm tra mật độ dưới kính hiển vi soi ngược (khoảng 50 tế bào trên 1 vi trường).

### 2.2.2. Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ sử dụng kit đầu dò *Vysis CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit* của hãng Abbott để đánh dấu vào nhiễm sắc thể giới: màu xanh trên nhiễm sắc thể X (Xp11.1-q11.1) và màu đỏ trên nhiễm sắc thể Y (Yq12).

Nhỏ hỗn hợp đầu dò (1 $\mu$ L đầu dò và 9 $\mu$ L đệm) vào vùng tế bào đã đánh dấu trên tiêu bản. Che phủ vùng lai đầu dò bằng lamén 18x18mm, cố định lamén bằng cao su. Biến tính tiêu bản ở 72°C trong 5 phút và lai đầu dò ở 37°C qua đêm. Sau khi lai, tiêu bản được rửa để loại bỏ đầu dò thừa bằng dung dịch SSC 2X (3 phút ở 72°C, 2 phút ở nhiệt độ phòng) và rửa nhanh bằng nước cất. Để tiêu bản khô tự nhiên, nhỏ 7 $\mu$ L DAPI II Counterstain lên

vùng tế bào, che phủ bằng lamén 22x22mm và cố định bằng sơn móng tay.

Tiêu bản được phân tích dưới kính hiển vi huỳnh quang với các bộ lọc khác nhau để xác định nguồn gốc marker.

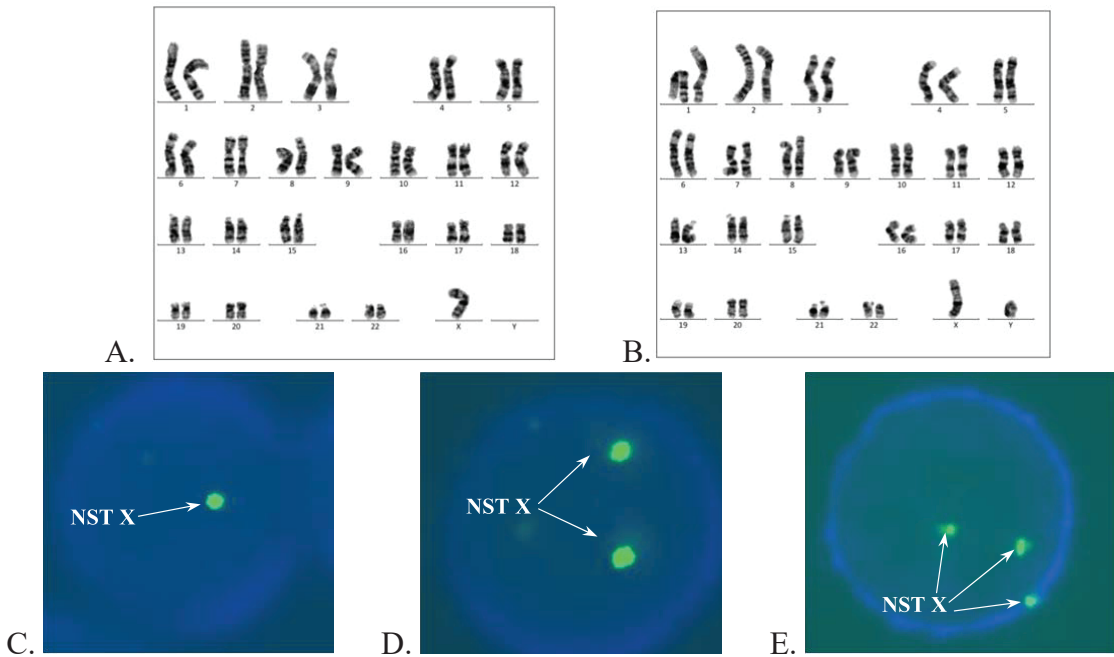
### III. Kết quả

Trong năm 2020, có 3103 bệnh nhân có chỉ định phân tích công thức nhiễm sắc thể từ máu ngoại vi, trong đó 05 bệnh nhân phát hiện ra marker chưa rõ nguồn gốc. Các bệnh nhân này sau đó tiếp tục được làm thêm kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ với đầu dò cho nhiễm sắc thể X và nhiễm sắc thể Y để xác định nguồn gốc marker. Kết quả lai huỳnh quang tại chỗ đã giúp xác định được nguồn gốc của các marker này (xem Bảng 1).

**Bảng 1.** Danh sách bệnh nhân phát hiện ra marker trên công thức nhiễm sắc thể năm 2020

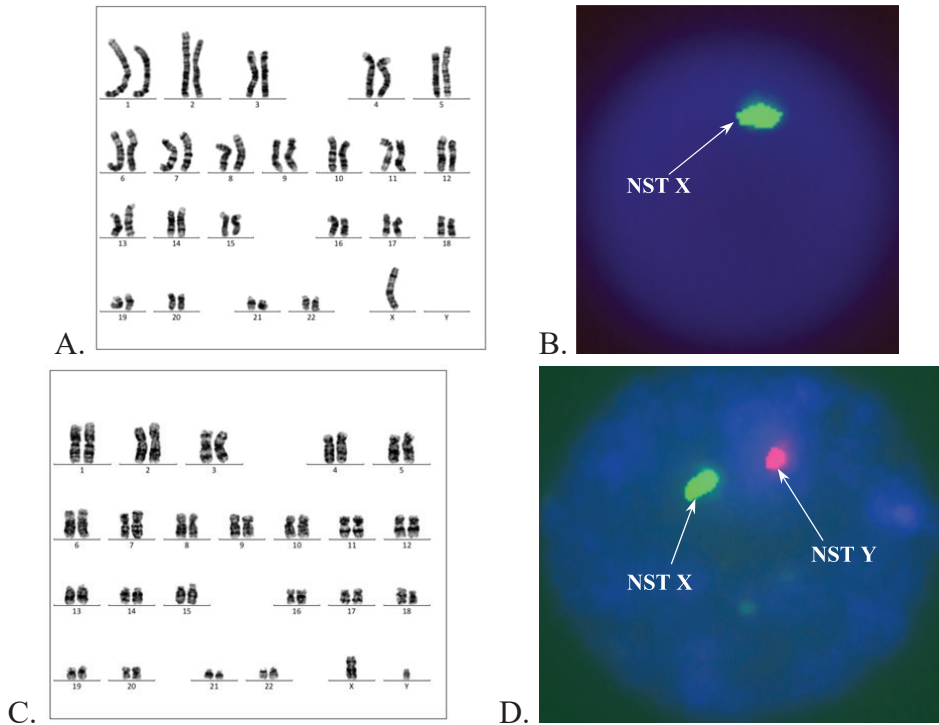
STT	Giới tính	Tuổi	Chẩn đoán lâm sàng	Công thức NST	Kết quả FISH
1	Nữ	10	Chiều cao thấp	46,X,+mar	1 NST X và 1 NST Y
2	Nữ	1	Chậm phát triển	46,X,+mar	1 NST X và 1 NST Y
3	Nữ	3	Chân cong	Khảm 2 dòng tế bào 45,X (80%) 46,X,+mar (20%)	Khảm 3 dòng tế bào 1 NST X (80,3%) 2 NST X (18%) 3 NST X (1,7%)
4	Nữ	7	TD Hội chứng Turner	Khảm 2 dòng tế bào 45,X (84%) 46,X,+mar (16%)	Khảm 2 dòng tế bào 1 NST X (82,7%) 1 NST X và 1 NST Y (17,3%)
5	Nữ	4	Chậm phát triển thể chất	Khảm 2 dòng tế bào 45,X (30%) 46,X,mar (70%)	Khảm 2 dòng tế bào 1 NST X (69%) 2 NST X (31%)

Các tín hiệu huỳnh quang trong nghiên cứu này đều rõ ràng, không có tín hiệu nhiễu cho phép phân tích chính xác số lượng nhiễm sắc thể X và nhiễm sắc thể Y cũng như loại trừ các trường hợp dương tính hay âm tính giả (xem hình 1 và 2)



**Hình 1.** Kết quả công thức nhiễm sắc thể và FISH của bệnh nhân Mai T. A.

Công thức nhiễm sắc thể với băng G: 45,X (hình A), 46,X,+mar (hình B); kết quả FISH: 1 tín hiệu NST X (hình C), 2 tín hiệu NST X (hình D), 3 tín hiệu NST X (hình E)



**Hình 2.** Kết quả công thức nhiễm sắc thể và FISH của bệnh nhân Nguyễn T. T. N.

Công thức nhiễm sắc thể với băng G: 45,X (hình A), 46,X,+mar (hình C); kết quả FISH: 1 tín hiệu NST X (hình B), 1 tín hiệu NST X và 1 tín hiệu NST Y (hình D)

#### IV. Bàn luận

Trong năm 2020, chúng tôi đã xác định được 05 bệnh nhân có marker trong công thức nhiễm sắc thể từ máu ngoại vi. Tỷ lệ phát hiện trong nghiên cứu này là khoảng 0,16%, cao hơn so với số liệu công bố trên thế giới (1:2250 như đã được đề cập ở trên).

Trong nghiên cứu này, đầu dò huỳnh quang hai màu của hãng Abbott đánh dấu vào nhiễm sắc thể X (màu xanh) và nhiễm sắc thể Y (màu đỏ) được lựa chọn để xác định nguồn gốc marker. Trước hết, tất cả bệnh nhân có marker đều là các bệnh nhân có ngoại hình nữ và có các biểu hiện lâm sàng nghi ngờ bất thường nhiễm sắc thể giới như chậm phát triển, chiều cao thấp. Đối với nhóm bệnh nhân này, việc xác định chính xác các biến đổi di truyền, nếu có, đặc biệt là các bất thường liên quan đến nhiễm sắc thể giới có vai trò rất quan trọng để nâng cao kết quả điều trị cho bệnh nhân. Tiếp theo, kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ với đầu dò này là một kỹ thuật được thực hiện thường quy tại khoa Di truyền và Sinh học Phân tử, có độ tin cậy và chính xác cao.

Việc xác định nguồn gốc các marker được phát hiện trên công thức nhiễm sắc thể có nhiều giá trị trong điều trị và theo dõi bệnh nhân. Sự có mặt của toàn bộ hay một phần nhiễm sắc thể Y trong công thức nhiễm sắc thể của bệnh nhân nữ nghi ngờ mắc hội chứng Turner là một yếu tố làm tăng nguy cơ (khoảng từ 27%-30%) hình thành các khối u ở tuyến sinh dục, đặc biệt là khối u nguyên bào sinh dục (gonadoblastoma) [8-9]. Bên cạnh đó, các bệnh nhân nữ mang bất thường này cũng có nguy cơ nam hóa cao hơn so với các bệnh nhân khác, bởi vì các tế bào rối loạn di truyền có trong tuyến sinh dục có thể sản xuất nội tiết tố androgen. Theo công bố trên thế giới, tỷ lệ gặp marker trong công thức nhiễm sắc thể của các bệnh nhân Turner là

khoảng 3%, trong đó, tỷ lệ marker có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể là 1% - 2% [1]. Việc xác định được 3/5 marker trong nghiên cứu này có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể Y đã mang lại hướng điều trị đúng cho bệnh nhân.

Còn đối với các marker có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể X, biểu hiện lâm sàng của các trường hợp này phụ thuộc vào kích thước và liều lượng gen trên marker, đặc biệt là 2 gen AR và XIST [3]. Gen AR (ở vị trí q11.2-q12 trên nhiễm sắc thể X) là một gen tham gia vào việc phát triển sinh sản ở nam giới và chức năng của testosterone. Do đó, gen AR rất quan trọng đối với sự phát triển sinh sản của cả nam và nữ. Gen XIST (ở vị trí q13.2 trên nhiễm sắc thể X) là gen chịu trách nhiệm cho việc bất hoạt nhiễm sắc thể X. Do thiết kế đầu dò của hãng Abbott chỉ đánh dấu vào vùng tâm động nên trong nghiên cứu này, chúng tôi không xác định được có mặt hay không của các gen nói trên ở 2 marker có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể X.

Việc sử dụng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ trong nghiên cứu này không chỉ xác định được nguồn gốc marker, mà còn cho phép xác định chính xác số lượng và tỷ lệ các dòng tế bào khác nhau trên bệnh nhân mang thể khảm. Các kết quả này cũng góp phần vào việc chẩn đoán chính xác tình trạng bệnh của bệnh nhân để lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp. Với khả năng phân tích từ vài trăm đến hơn 1000 tế bào trên tiêu bản, kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ có độ nhạy và độ chính xác cao hơn so với kỹ thuật phân tích công thức nhiễm sắc thể, từ đó phản ánh chính xác hơn các bất thường trong bộ máy di truyền của từng bệnh nhân. Trong nghiên cứu này, có một bệnh nhân chỉ phát hiện được 2 dòng tế bào khác nhau là 45,X (80%) và 46,X,+mar (20%) bằng công thức nhiễm sắc thể băng G nhưng với kỹ thuật FISH, dòng tế bào 47,

cũng đã được phát hiện thêm. Điều này là phù hợp hơn với lý thuyết về phân bào. Ở một bệnh nhân khác, kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ mang lại kết quả điều trị tốt hơn cho bệnh nhân khi cho thấy dòng tế bào 45,X chiếm ưu thế hơn so với dòng 46,XY [4].

## V. Kết luận

Nghiên cứu này cho thấy kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ là một công cụ đáng tin cậy và có khả năng xác định được nguồn gốc các marker nhiễm sắc thể, một bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể hiếm gặp. Việc xác định rõ ràng này có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán, điều trị, tiên lượng cho bệnh nhân và phòng bệnh.

## Tài liệu tham khảo

- [1] Bianco B, Lipay MVN, Guedes AD et al. Clinical implications of the detection of Y-chromosome mosaicism in Turner's syndrome: report of 3 cases. *Fertil Steril* 2008;90(4):1197.e17-20. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.014>
- [2] Jang W, Chae H, Kim J et al. Identification of small marker chromosomes using microarray comparative genomic hybridization and multicolor fluorescent in situ hybridization. *Mol Cytogenet* 2016;9:61. <https://doi.org/10.1186/s13039-016-0273-5>
- [3] Kalkan R, Ozdag N, Bundak R et al. A unique mosaic Turner syndrome patient with androgen receptor gene derived marker chromosome. *Syst Biol Reprod Med* 2016;62(1):77-83. <https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1109007>
- [4] Stochholm K, Juul S, Juel K et al. Prevalence, Incidence, Diagnostic Delay, and Mortality in Turner Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006;91(10):3897-3907. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0558>
- [5] Liehr T. CG-CNVs. *Benign and Pathological Chromosomal Imbalances* 2014;2:13-24
- [6] Liehr T. Formation of CG-CNVs. *Benign & Pathological Chromosomal Imbalances* 2014;4:29-36
- [7] Reddy KS, Aradhya S, Meck J et al. A systematic analysis of small supernumerary marker chromosomes using array CGH exposes unexpected complexity. *Genetics in Medicine* 2013;15(1):3-13. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.78>
- [8] Rojek A, Obara-Moszynska M, Kolesinska Z et al. Molecular Detection and Incidence of Y Chromosomal Material in Patients with Turner Syndrome. *Sexual Development* 2017;11(5-6):254-261. <https://doi.org/10.1159/000484880>
- [9] Sallai A, Solyom J, Dobos M et al. Y-chromosome markers in Turner syndrome: Screening of 130 patients. *J Endocrinol Invest* 2010;33(4):222-227. <https://doi.org/10.1007/bf03345783>
- [10] Tesner P, Vlckova M, Drabova J et al. Molecular Cytogenetic Diagnostics of Marker Chromosomes: Analysis in Four Prenatal Cases and Long-Term Clinical Evaluation of Carriers. *Cytogenetic and Genome Research* 2018;154(4):187-195. <https://doi.org/10.1159/000488790>