

KỸ THUẬT ARRAY CGH* VÀ ỨNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH

* Array CGH : Microarray-based comparative genomic hybridization

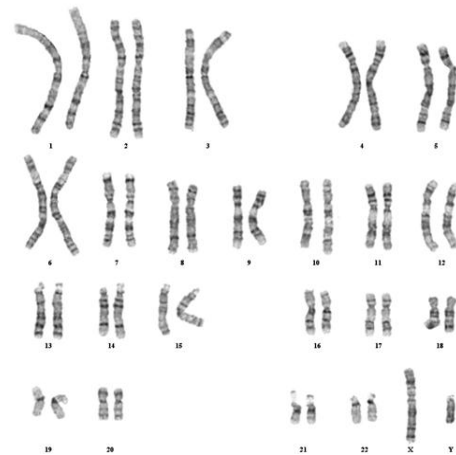
Nguyễn Việt Nhân, Hà Thị Minh Thi, Nguyễn Vũ Quốc Huy.
Trường Đại Học Y Dược Huế

Các bất thường không cân bằng của nhiễm sắc thể (NST) được gặp khá phổ biến với tỉ lệ khoảng 2/100 trẻ sinh sống [28]. Việc xác định căn nguyên di truyền liên quan đến loại bất thường này cho nhiều trường hợp bệnh lý là rất cần thiết để tư vấn di truyền và can thiệp về mặt y tế nhất là đối với các trường hợp chậm phát triển tâm thần và dị tật bẩm sinh, những bất thường chiếm tỷ lệ cao trong quần thể. Để đáp ứng nhu cầu này, các kỹ thuật phát hiện các bất thường NST không ngừng phát triển để có thể phát hiện các bất thường của NST với độ phân giải ngày mỗi cao hơn. Bài viết này nhằm điểm lại một số phương pháp phân tích NST truyền thống và giới thiệu về kỹ thuật array CGH, một kỹ thuật mới trong chẩn đoán các bất thường không cân bằng của NST.

1. ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH NHIỄM SẮC THỂ KHÔNG SỬ DỤNG KỸ THUẬT MICROARRAY

1.1. KỸ THUẬT LẬP KARYOTYPE BẰNG G

Để phân tích đặc điểm bộ NST của một cá thể về cả số lượng lẫn cấu trúc, người ta dựa trên bộ NST của tế bào ở kỳ giữa (metaphase) hoặc tiền kỳ giữa (pro-metaphase) của nguyên phân để lập karyotype. Kỹ thuật được sử dụng phổ biến để lập karyotype là kỹ thuật nhuộm băng G (hình 1) hiện được sử dụng trong hầu hết các phòng xét nghiệm di truyền tế bào học và được coi là một trong những phương pháp phân tích di truyền tế bào học truyền thống [43]. Mặc dù đã có những phần mềm hỗ trợ cho việc lập karyotype nhưng để có một karyotype phục vụ tốt cho chẩn đoán và phân tích các băng trên NST đòi hỏi rất nhiều đến kỹ năng và kinh nghiệm của người làm tiêu bản và người đọc kết quả.

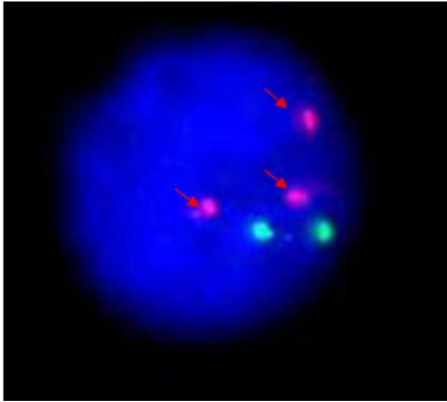


Hình 1: Karyotype của một người nam bình thường

Với kỹ thuật nhuộm băng G độ phân giải của NST thường nằm trong giới hạn từ 350 - 850 băng trên bộ NST đơn bội với kích thước mỗi băng từ 5-10Mb (Mb: megabase, 1Mb = 1.000.000 bases) ở độ phân giải bình thường và kích thước mỗi băng từ 3 - 5 Mb đôi ở độ phân giải cao, do đó kỹ thuật này chỉ cho phép phát hiện các bất thường có kích thước lớn hơn 3 Mb [42]. Các trường hợp bất thường NST có kích thước bé hơn kích thước trên sẽ không thể được phát hiện [13]. Nhiều trường hợp tái sắp xếp của NST rất

khó phát hiện hoặc không thể phát hiện được bằng kỹ thuật này do kích thước quá nhỏ, cường độ thuốc nhuộm không đủ và thiếu các mẫu băng ở những đoạn NST đã bị thay đổi. Để khắc phục nhược điểm này các phương pháp di truyền tế bào - phân tử (molecular cytogenetic methods) đã được phát triển trong các thập niên 1980 và 1990.

1.2. KỸ THUẬT LAI HUỖNH QUANG TẠI CHỖ (FISH: Fluorescence In Situ Hybridization)

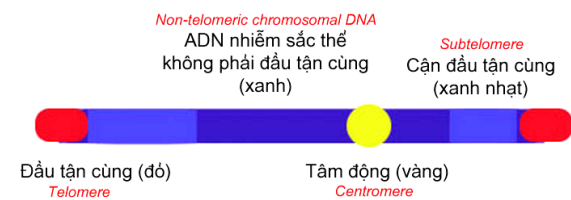


Hình 2: Ứng dụng kỹ thuật FISH để chẩn đoán

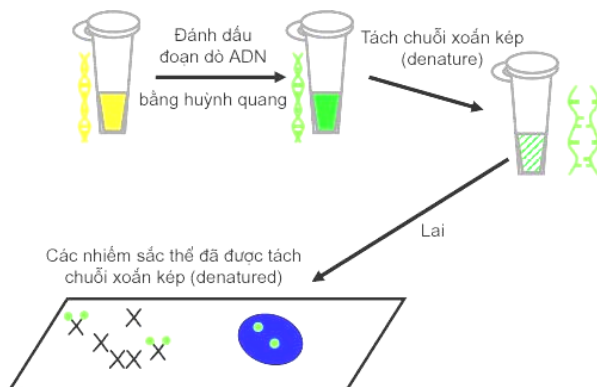
điều này đặc biệt có ý nghĩa đối với các xét nghiệm cần có kết quả nhanh như trong trường hợp phát hiện các bất thường số lượng của NST 13, 18, 21 và X, Y trong chẩn đoán trước sinh (hình 2) [52]. Các ứng dụng của FISH khá rộng bao gồm việc phát hiện các trường hợp lệch bội trong chẩn đoán trước sinh, trong một số các trường hợp u ác tính, trong bệnh ung thư máu, ung thư hạch bạch huyết (lymphoma), đánh giá các trường hợp vi mất đoạn (microdeletion) trong các hội chứng gen kề (contiguous gene syndromes) và sự tái sắp xếp ở các vùng như vùng cận đầu tận cùng (subtelomere) của NST (hình 3).

Kỹ thuật FISH là một trong những kỹ thuật di truyền tế bào học - phân tử được sử dụng để xác định một cách hiệu quả số lượng và vị trí của các đoạn ADN đặc hiệu trên NST ở kỳ giữa hoặc trong nhân tế bào ở gian kỳ và cũng được coi như là một phương pháp phân tích di truyền tế bào học truyền thống.

Việc thực hiện kỹ thuật FISH trên tế bào ở gian kỳ đã làm cho việc chuẩn bị mẫu xét nghiệm trở nên đơn giản và thời gian thực hiện xét nghiệm nhanh chóng hơn rất nhiều so với việc lập karyotype,



Hình 3 : Phân bố các vùng trên nhiễm sắc thể



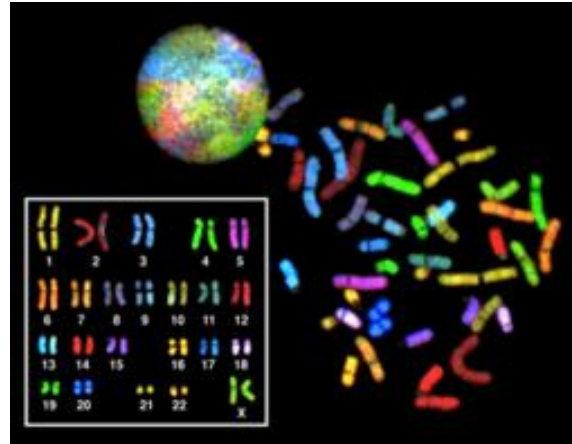
Hình 4: Nguyên tắc của kỹ thuật FISH

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ có thể thực hiện trên các đầu tận cùng hoặc vùng cận đầu tận cùng của NST (subtelomeric FISH) hoặc trên các mục tiêu đã được xác định trước trên NST (targeted FISH) thông qua các đoạn dò ADN đặc hiệu cho các lôcút hoặc một trình tự nucleotit nhất định trên NST. Những đoạn dò ADN này được thiết kế và đánh dấu bằng các loại thuốc nhuộm huỳnh quang, trên tiêu bản đánh giá đoạn dò sẽ lai với đoạn ADN tương ứng trong genome

theo nguyên tắc bổ sung và phát tín hiệu màu huỳnh quang, các tín hiệu này sẽ được phân tích dưới kính hiển vi huỳnh quang (hình 4) để đánh giá các bất thường đặc hiệu của NST.

Bên cạnh các đoạn dò đặc hiệu cho từng locus trên NST, các loại đoạn dò cho phép nhuộm huỳnh quang nguyên một NST cũng được phát triển để đánh giá toàn bộ NST (kỹ thuật SKY: spectral karyotype) (hình 5) [49].

Kỹ thuật FISH cho phép phát hiện các bất thường NST có kích thước bé hơn 1Mb, tùy thuộc vào kích thước của các đoạn dò được sử dụng. Các đoạn dò này chủ yếu là ADN lấy từ các nhiễm sắc thể vi khuẩn nhân tạo (BAC: bacterial artificial chromosome) có kích thước khoảng từ 150 – 350 Kb (1Kb = 1000 bazơ).



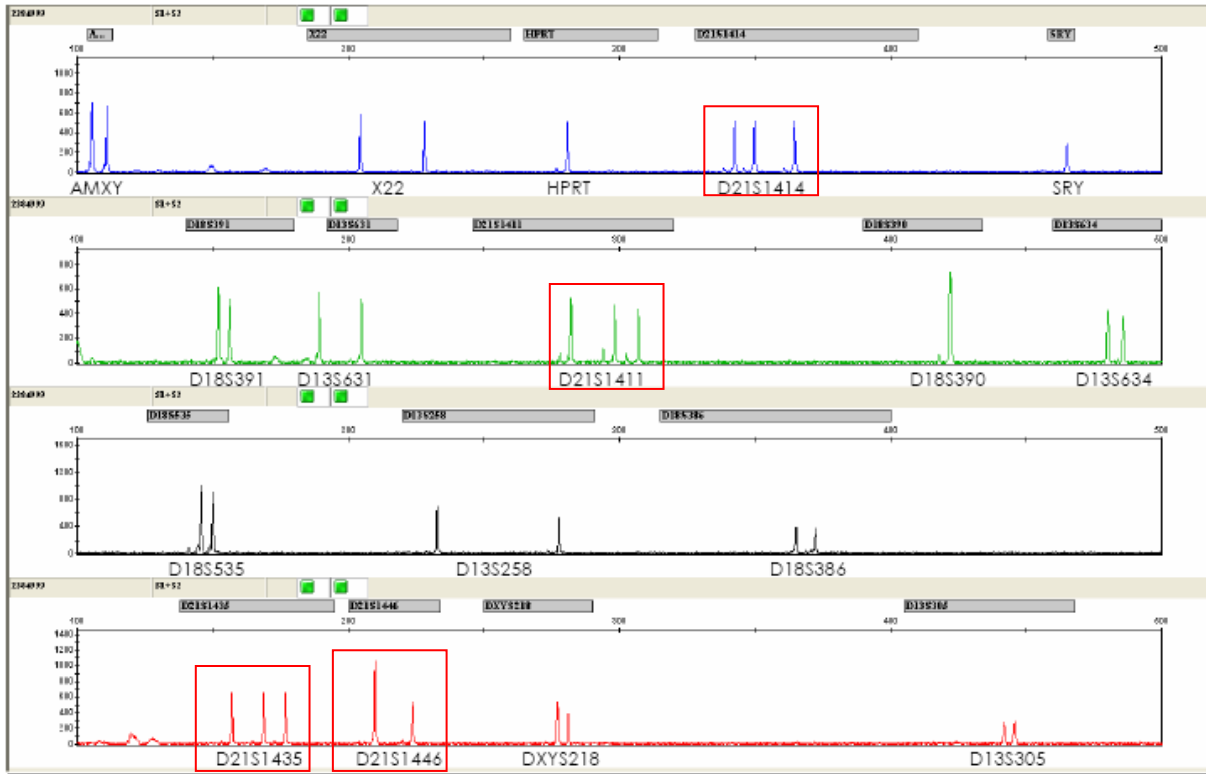
Hình 5: Lập karyotype với kỹ thuật SKY

Mặc dù là một công cụ chẩn đoán khá hiệu quả nhưng FISH cũng có những giới hạn nhất định. Một trong những giới hạn chính của kỹ thuật này là để chỉ định xét nghiệm bằng kỹ thuật FISH, bác sĩ cần định hướng tới một hội chứng liên quan đến bất thường NST dựa trên biểu hiện lâm sàng điển hình của bệnh nhân hoặc trong trường hợp karyotype cho thấy có các bất thường đòi hỏi phải có thêm các phân tích sâu hơn về NST để trên cơ sở đó quyết định lựa chọn đoạn dò thích hợp. Các đoạn dò trong FISH cho phép phát hiện tình trạng thừa, mất hoặc tái sắp xếp của các đoạn ADN đặc hiệu nhưng không thể cung cấp thông tin về phần còn lại của genome do đó ngoài các đoạn dò đã được định sẵn FISH không thể phát hiện thêm những bất thường khác trong genome. Một hạn chế khác nữa của FISH do hạn chế về loại màu huỳnh quang hiện có để đánh dấu các đoạn dò dẫn đến sự giới hạn trong số lượng các đoạn dò khác nhau có thể được sử dụng đồng thời trên cùng một mẫu đánh giá [19],[3].

1.3. KỸ THUẬT ĐỊNH LƯỢNG HUỖNH QUANG PCR (QF-PCR: Quantitative Fluorescence PCR)

Kỹ thuật QF-PCR sử dụng các cặp mồi được thiết kế để khuếch đại các trình tự lặp nối tiếp ngắn (STR: short tandem repeat sequences) của các NST đặc hiệu và của các vùng có tính đa hình cao. Bằng cách kết hợp màu huỳnh quang trong quá trình khuếch đại nên kỹ thuật này cho phép định lượng các sản phẩm cho mỗi STR đặc hiệu của từng NST. Dựa trên nguyên tắc này QF-PCR có thể phát hiện các dạng lệch bội phổ biến và các bất thường số lượng NST giới tính một cách nhanh chóng thông qua chỉ một phản ứng (hình 6) [21]. Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy đây là một kỹ thuật chẩn đoán có độ tin cậy cao [29]; [32]. Một điểm thuận lợi nữa của kỹ thuật QF-PCR là không đòi hỏi phải thực hiện việc nuôi cấy tế bào và tự động hóa do đó cho phép trả kết quả chẩn đoán trước sinh chỉ trong vòng từ 24 đến 48 giờ. Tuy nhiên hạn chế lớn nhất của kỹ thuật này

so với kỹ thuật lập karyotype truyền thống là QF-PCR không cho phép đánh giá toàn bộ genome và do đó không thể phát hiện hết được tất cả các bất thường của các NST trong bộ NST như khi đánh giá bằng phân tích karyotype [15]. Chính vì lý do này mà kỹ thuật QF-PCR thường được sử dụng phối hợp mà không thể thay thế cho kỹ thuật lập karyotype truyền thống.



Hình 6: sử dụng kỹ thuật QF- PCR trong chẩn đoán trường hợp lệch bội, trên hình là trường hợp trisomy 21 được chẩn đoán bằng QF-PCR.

2. OKỸ THUẬT ARRAY CGH

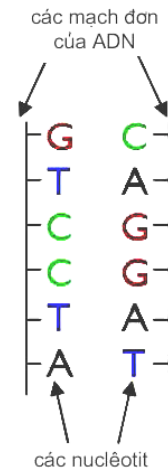
Trong thập niên 1990 kỹ thuật CGH (Comparative Genomic Hybridization) bắt đầu được phát triển. Về bản chất kỹ thuật này cũng tương tự kỹ thuật FISH nhưng cho phép đánh giá trên toàn bộ genome tình trạng mất cân bằng của bộ NST. CGH cũng vấp phải giới hạn về độ phân giải, kỹ thuật CGH trong giai đoạn này chỉ cho phép phát hiện các bất thường có kích thước trong giới hạn 10 – 20 Mb [14] và trong một số nghiên cứu kích thước nằm trong giới hạn 5 – 10Mb [12]. Vào cuối thập niên 1990 kỹ thuật array CGH (Comparative Genomic Hybridization microarray) ra đời cho phép giải quyết những vấn đề tồn đọng của kỹ thuật CGH và khắc phục những nhược điểm của kỹ thuật lập karyotype và kỹ thuật FISH. Với array CGH những bất thường trên NST xảy ra ở dưới mức phát hiện của kính hiển vi (submicroscopic) dưới dạng vi mất đoạn

(microdeletion) hoặc vi nhân đoạn (microduplication) có thể được phát hiện một cách dễ dàng.

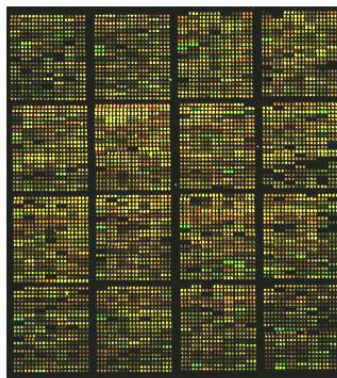
2.1. NGUYÊN TẮC

Kỹ thuật array CGH thực hiện việc so sánh mẫu ADN cần phân tích với mẫu ADN chứng và thông qua sự khác biệt giữa 2 ADN này để phát hiện các trường hợp mất đoạn hoặc nhân đoạn nếu có trên ADN. Nguyên lý của kỹ thuật array CGH được dựa trên khả năng bắt cặp (base pair) hoặc còn được gọi một cách khác là lai (hybridise) giữa một mạch đơn của ADN này và một mạch đơn của ADN khác theo nguyên tắc bổ sung giữa các bazơ adenin (A) và Tymin (T), Guanin (G) và Cytôzin (C) của các nuclêôtit (hình 6).

Trong kỹ thuật array CGH, hàng ngàn đoạn ngắn ADN (gọi là các đoạn dò) được sắp xếp một cách chính xác tại những vị trí nhất định trên lam kính thành một hệ thống lưới được gọi là con **chip** (hình 8). Đầu tiên mẫu ADN cần phân tích sẽ được cắt thành những đoạn ngắn, những đoạn ADN này được nhuộm màu huỳnh quang, mẫu ADN chứng không mang bất thường về mặt di truyền sẽ được nhuộm bằng một màu huỳnh quang khác, hai loại màu huỳnh quang được sử dụng phổ biến là màu đỏ và xanh lục. Sau đó hai mẫu ADN này sẽ được trộn lẫn với nhau và cho lên con chip để tiến hành quá trình lai. Các đoạn ADN này sẽ lai với các đoạn dò tương ứng trên con chip.



Hình 7: Sự bắt cặp giữa 2 mạch của ADN theo nguyên tắc bổ sung



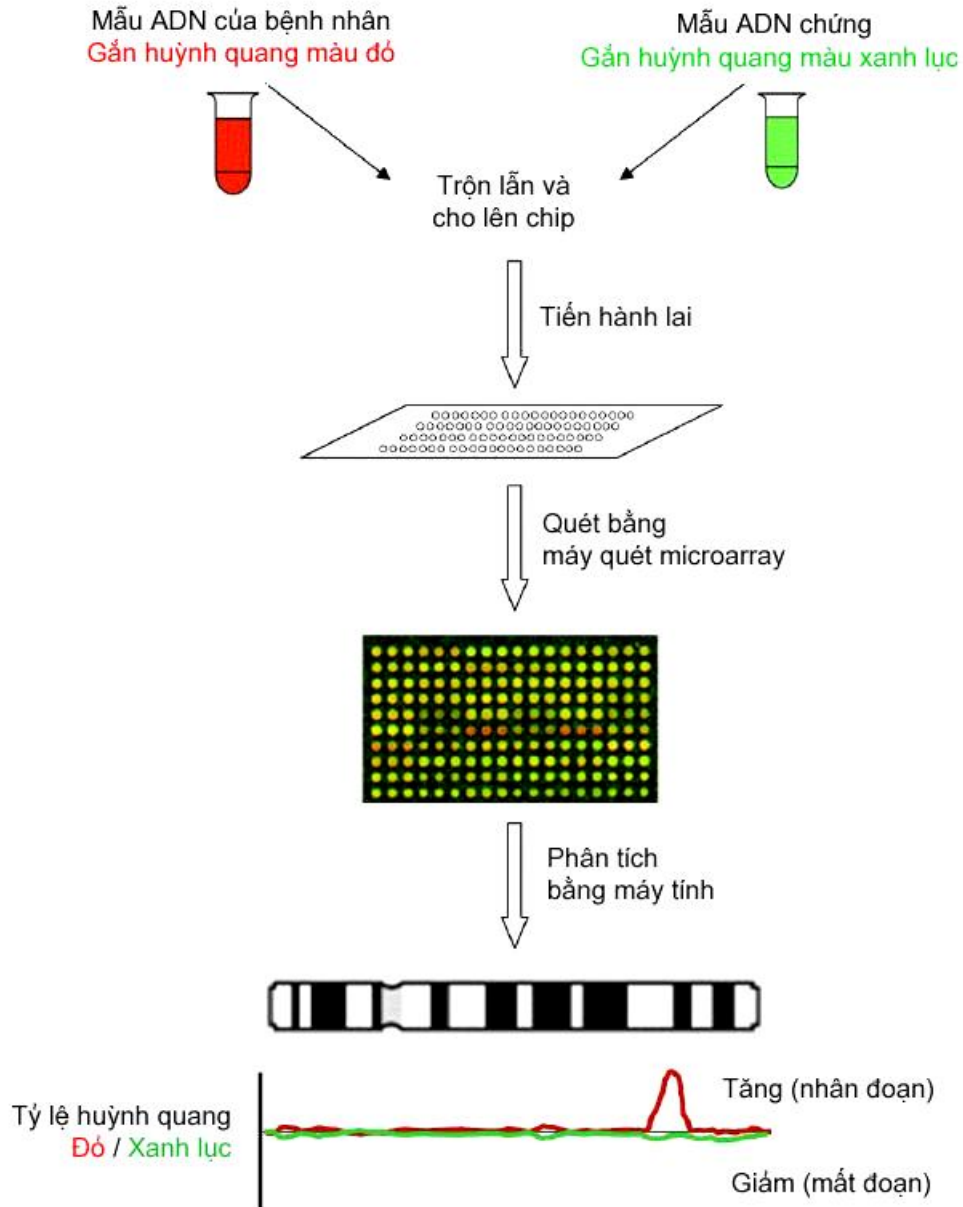
Hình 8: Chip sử dụng trong kỹ thuật microarray với kích thước $\leq 50\text{kb}$

Sau khi hoàn tất quá trình lai con chip sẽ được đọc trên máy quét microarray (microarray scanner) để đo lượng huỳnh quang màu đỏ và xanh lục ứng với mỗi vị trí trên con chip (hình 9) [33]; [46]; [47] và phân tích bằng phần mềm chuyên dụng trên máy tính để tính tỷ số giữa màu huỳnh quang đỏ và xanh lục tại mỗi vị trí ứng với một đoạn dò đặc hiệu trên chip để xác định tình trạng thừa, thiếu hoặc cân bằng vật liệu di truyền giữa mẫu ADN

cần phân tích và ADN chứng tại vị trí đó (hình 10)[4]; [11].

Nếu mẫu ADN cần phân tích có lượng bình thường sẽ thể hiện trên chip bằng màu vàng do có sự cân bằng giữa lượng ADN cần phân tích và mẫu ADN chứng, nếu bị thừa ADN (nhân đoạn) sẽ thể hiện bằng màu đỏ do có lượng ADN cần phân tích nhiều hơn so

với mẫu ADN chứng và nếu bị thiếu ADN (mất đoạn) sẽ thể hiện bằng màu xanh lá cây do có lượng ADN cân phân tích ít hơn so với mẫu ADN chứng.

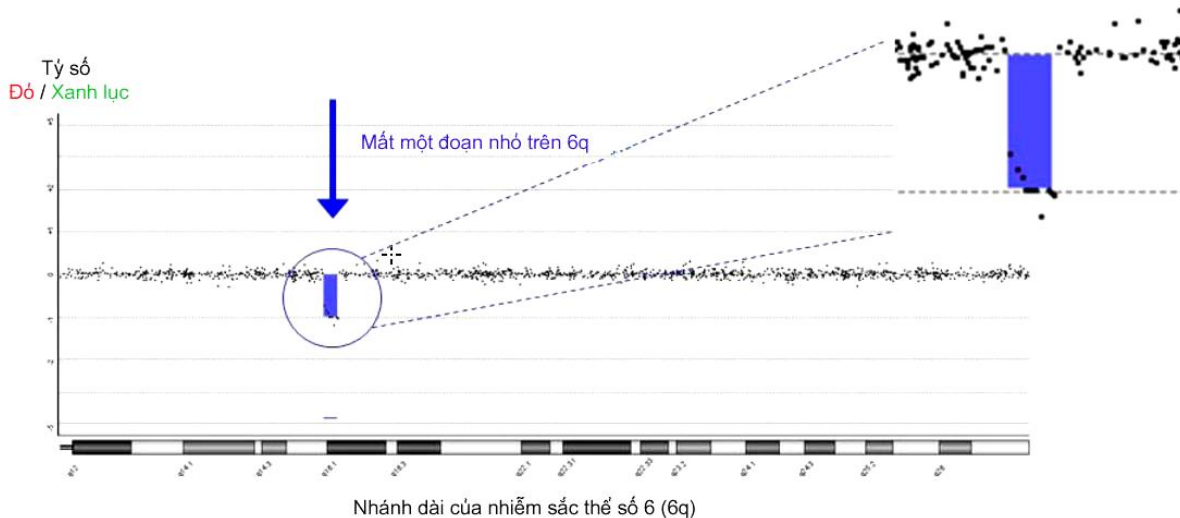


Hình 9: Sơ đồ minh họa các bước cơ bản trong kỹ thuật array CGH, hình cuối cùng cho thấy bệnh nhân bị nhân đoạn

Để đánh giá trình trạng bình thường, thừa hoặc mất đoạn của ADN cần phân tích so với ADN chứng ứng tại mỗi vị trí của đoạn dò, \log_2 tỷ số của cường độ bắt màu huỳnh quang giữa mẫu bệnh / mẫu đối chứng được sử dụng để tính toán [24]:

- \log_2 giữ vai trò trung tâm, với giá trị bằng 0

- Trường hợp mất đoạn bán hợp tử (hemizygote deletion) của mẫu bệnh:
 $\log_2(\text{bệnh/chúng}) = \log_2(1/2) = -1$
- Trường hợp nhân đoạn (duplication) của mẫu bệnh:
 $\log_2(\text{bệnh/chúng}) = \log_2(3/2) = 0,59$
- Trường hợp nhân đoạn đồng hợp tử (homozygous duplication):
 $\log_2(\text{bệnh/chúng}) = \log_2(4/2) = 1$



Hình 10: Một mất đoạn nhỏ trên NST số 6 được chẩn đoán bằng xét nghiệm array CGH. Mỗi chấm đen đại diện cho một đoạn dò oligo (oligo probe), có tất cả 10 đoạn dò trong vùng bị mất đoạn (có màu lam và được phóng đại phía bên phải hình vẽ).

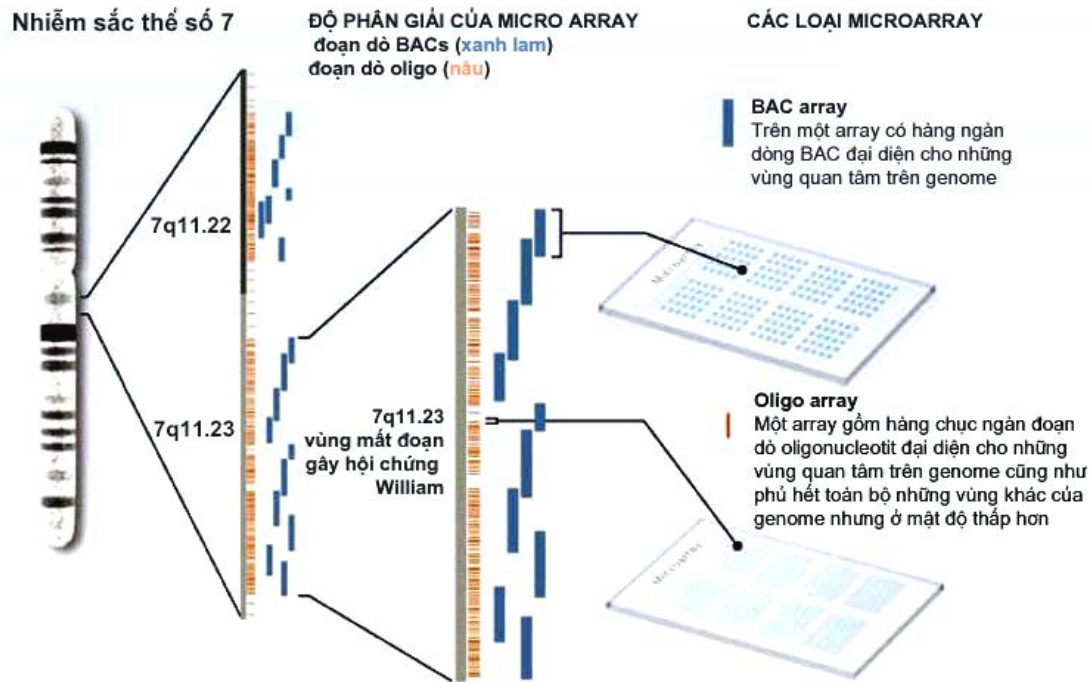
2.2. CÁC LOẠI ARRAY CGH

Có hai loại đoạn dò được sử dụng phổ biến trong kỹ thuật array CGH để phát hiện các bất thường của NST (hình 11) :

- Đoạn dò là các dòng nhiễm sắc thể vi khuẩn nhân tạo (BAC: bacterial artificial chromosome) [47] chứa các đoạn ngắn ADN của người với kích thước thay đổi từ 75 đến 150 Kb [56] được sử dụng để phát hiện các thay đổi đơn bản (single copy) trong genome với độ nhạy cao. Nhược điểm của BACs là không cho phép đánh giá những bất thường có kích thước bé hơn kích thước của các đoạn dò [53];[56]. Một nhược điểm khác của BACs là việc tạo ra các dòng BAC phục vụ cho kỹ thuật array CGH khá tốn kém và tiêu tốn nhiều thời gian.
- Các đoạn dò oligonucleotit gọi tắt là oligo là các đoạn ADN ngắn nhân tạo có kích thước từ 25 đến 85 bazơ (mer). Các oligonucleotit được thiết kế và tổng hợp khá dễ dàng, tùy theo mức độ thiết kế mà các đoạn dò oligonucleotit cho phép đánh giá toàn bộ genome với độ phân giải rất cao [56] nhờ đó array CGH có thể phát hiện các trường hợp thừa hoặc mất các đoạn rất ngắn trong genome.

Tuy nhiên một vấn đề đặt ra là những thay đổi nhỏ trên genome được phát hiện qua kỹ thuật microarray có thể không gây ra những hậu quả về mặt lâm sàng do đó cần có thêm các nghiên cứu để làm rõ mối liên hệ này [56]; [43].

Đã có nhiều nghiên cứu so sánh tính hiệu quả của BACs và các oligonucleotit trong việc phát hiện các bất thường trên genome, kết quả cho thấy các oligonucleotit cho phép phát hiện nhiều bất thường hơn và các bất thường có kích thước nhỏ hơn so với BACs [53]. Tuy nhiên hiện nay cả hai kỹ thuật array CGH dựa trên BACs và oligonucleotit đều được sử dụng phục vụ cho công tác chẩn đoán.



Hình 11: Hai loại đoạn dò được dùng phổ biến trong kỹ thuật array CGH

Về mặt thực hành array CGH được chia làm hai loại:

- Array có mục tiêu (targeted array): gồm ít đoạn dò, phủ tối đa những vùng đã được biết có các gen gây bệnh.
- Array toàn bộ genome (whole genome array): gồm các đoạn dò phủ toàn bộ genome.

2.3. MÔ TẢ KẾT QUẢ

Kết quả trong kỹ thuật array CGH tùy thuộc vào từng trường hợp cụ thể và khả năng của mỗi phòng xét nghiệm trong việc sử dụng các đoạn dò, máy quét microarray. Ví dụ dưới đây minh họa kết quả của một trường hợp phân tích bằng kỹ thuật arrayCGH:

– Nếu được phân tích bằng các đoạn dò BAC, kết quả sẽ được trình bày như sau:

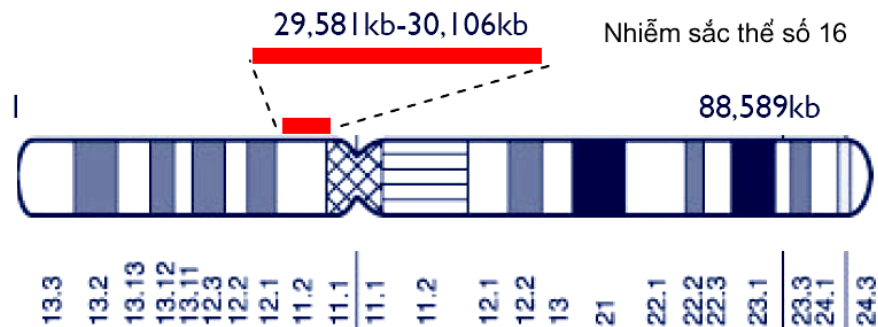
arr cgh 2p15p16.1(RP11-479F13→RP11-260K8)x1

- **arr cgh:** Kết quả được phân tích bằng kỹ thuật array CGH.
- **2:** Mất đoạn được thấy trên NST số 2.
- **p15p16.1:** NST có một vị trí đứt gãy ở băng 2p15 (băng 5 của vùng 1 trên nhánh ngắn của NST số 2) và một vị trí đứt gãy ở vị trí băng 2p16.1 (vùng dưới băng 1, băng 6 của vùng 1 trên nhánh ngắn của NST số 2) và mất đoạn NST giữa 2 vị trí này.
- **(RP11-479F13 →RP11-260K8)x1**
Vùng NST chỉ có mặt trên một bản sao thay vì phải có 2. Vùng bị mất nằm trong đoạn ADN được đánh dấu từ RP11-479F13 đến RP11-260K8.

– Nếu được phân tích bằng các đoạn dò oligo, kết quả sẽ được trình bày như sau:

arr cgh 16p11.2(29581455-30106101) x 1

- **arr cgh:** Kết quả được phân tích bằng kỹ thuật array CGH.
- **16p11.2:** Mất đoạn được thấy trên băng 11.2 (vùng dưới băng 2, băng 1 của vùng 1) trên nhánh ngắn của NST số 16.
- **(29581455-30106101) x 1**
Cặp bazơ đầu tiên bị mất (hình 12) ở số 29.581.455 tính từ phía trái của NST. Cặp bazơ cuối cùng của đoạn mất là 30.106.101.



Hình 12: Nhiễm sắc thể 16 bị mất đoạn từ cặp bazơ số 29.581.455 tính từ phía trái của NST đến bazơ số 30.106.101 (vùng màu đỏ)

2.4. ƯU ĐIỂM VÀ HẠN CHẾ CỦA KỸ THUẬT ARRAY CGH

2.4.1. Ưu điểm

Ưu điểm nổi bật của kỹ thuật array CGH là khả năng đánh giá trên toàn bộ 46 NST chỉ trong một xét nghiệm duy nhất và phát hiện các bất thường mất cân bằng của NST bao gồm các trường hợp lệch bội, mất hoặc nhân đoạn của NST chính xác hơn nhiều so với phương pháp lập karyotype. Kỹ thuật array CGH cho phép phát hiện các bất thường của NST ngay cả khi không có định hướng trong chẩn đoán, đây là một ưu thế của array CGH so với kỹ thuật FISH. Array CGH cũng phát hiện được các trường hợp khảm (mosaic) tuy nhiên sự chính xác trong chẩn đoán còn phụ thuộc vào tỷ lệ giữa dòng tế bào bình thường và tế bào đột biến [21];[55]. Trong trường hợp khảm với dòng tế bào đột

biến dạng lệch bội, array CGH cho phép phát hiện được ở mức khảm từ 10% trở lên trong khi đó tình trạng khảm với dòng tế bào đột biến mang nhân đoạn hoặc mất đoạn của một NST được phát hiện ở mức khảm từ 20 – 30% [50] trở lên. Hiện nay có thể nói array CGH là kỹ thuật hiệu quả nhất cho phép phân tích một cách toàn diện bộ NST, cho phép xác định một cách chính xác các bất thường không cân bằng của NST, phát hiện các gen liên quan đến những bệnh cảnh điển hình giúp cho việc đánh giá, theo dõi và điều trị hiệu quả hơn.

Array CGH cho phép phát hiện các NST đánh dấu (marker chromosome), loại NST không thể phát hiện trong kỹ thuật lập karyotype do kích thước của chúng quá nhỏ không đủ để cung cấp các mẫu băng đặc hiệu và không thể quan sát được dưới kính hiển vi. Đây có thể coi như là loại NST thứ 47 trong bộ NST vốn dĩ chỉ có 46 NST, hiện tượng này được gặp không phổ biến ở một số cá thể và được gọi là *nhiễm sắc thể đánh dấu nhỏ bổ sung* (sSMC: small supernumerary marker chromosome), chúng có thể có xuất xứ từ một trong số 24 NST khác nhau của NST người. Khoảng 70% trường hợp sSMC là đột biến mới, 30% được di truyền trong gia đình [17] và có khoảng 30% người mang sSMC có biểu hiện bất thường trên lâm sàng [18].

Một ưu điểm khác của array CGH là có thể thực hiện trên các mẫu tế bào không cần qua nuôi cấy để gia tăng số lượng tế bào và hoàn toàn tự động hóa nhờ đó giảm thiểu được thời gian xét nghiệm và tăng mức độ chính xác của chẩn đoán, điều này đặc biệt có ý nghĩa rất lớn trong các xét nghiệm trước sinh [26].

Các bất thường NST có thể được xác định bằng kỹ thuật array CGH:
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Các bất thường NST ở mức hiển vi:</i> <ul style="list-style-type: none"> – Lệch bội và các trường hợp khảm – Các loại chuyển đoạn không cân bằng – Các nhiễm sắc thể đánh dấu (marker chromosomes)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Các bất thường NST ở mức dưới hiển vi:</i> <ul style="list-style-type: none"> – Các hội chứng liên quan đến vi mất đoạn; vi nhân đoạn của NST. – Các trường hợp tái sắp xếp không cân bằng của vùng cận đầu tận cùng của NST.

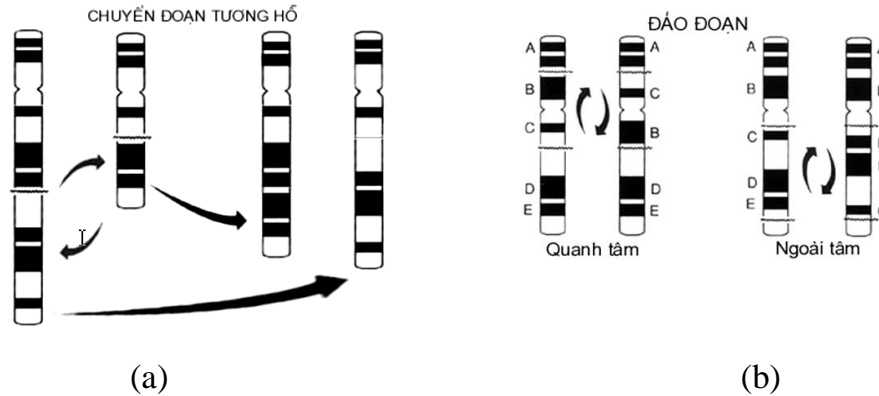
2.4.2. Hạn chế

Xuất phát từ nguyên tắc của kỹ thuật, hạn chế của kỹ thuật array CGH là không thể phát hiện các trường hợp bất thường trong cấu trúc NST ở dạng cân bằng như chuyển đoạn cân bằng và đảo đoạn (hình 13) do không xảy ra tình trạng thừa hoặc thiếu vật liệu di truyền. Array CGH không phân biệt được các trường hợp thể ba nhiễm (trisomy) với các trường hợp chuyển đoạn Robertson không cân bằng [34]; [21];[55].

Một số trường hợp lệch bội cũng có thể không được phát hiện như trường hợp XYY nếu mẫu ADN chúng bị chọn sai giới tính [21]. Array CGH cũng không thể phát hiện được các trường hợp khảm có tỷ lệ khảm thấp hơn 10% đối với trường hợp lệch bội và

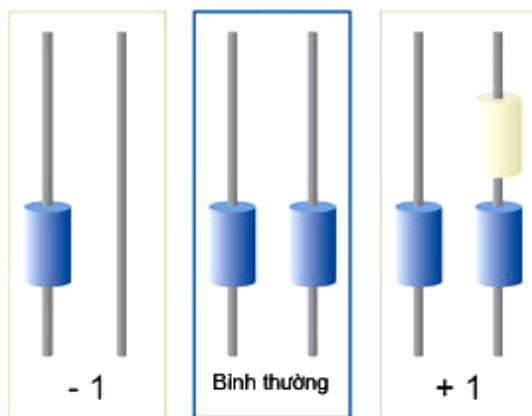
dưới 20 - 30% đối với trường hợp bất thường cấu trúc NST dạng mất cân bằng [50]. Một số loại array CGH không cho phép phát hiện được các dạng đa bội như tam bội (triploid) do đó kỹ thuật lập karyotype vẫn có ích và được chỉ định khi cần thiết.

Các trường hợp bệnh lí di truyền gây ra do đột biến điểm, loại đột biến gen chỉ liên quan đến một cặp bazơ trên ADN và các trường hợp đột biến gen mà trong đó số cặp bazơ bị ảnh hưởng bé hơn số bazơ được sử dụng làm đoạn dò trong kỹ thuật array CGH sẽ không thể được chẩn đoán bằng kỹ thuật array CGH.



Hình 13: Các dạng bất thường nhiễm sắc thể cân bằng: (a) Chuyển đoạn tương hỗ giữa 2 cặp nhiễm sắc thể không tương đồng. (b) Đảo đoạn.

Mặc dù array CGH cho phép phát hiện các sSMC nhưng chỉ có khoảng 30% người mang sSMC có biểu hiện bất thường trên lâm sàng, do đó có một vấn đề lớn tồn tại là nếu sSMC được phát hiện trong chẩn đoán trước sinh khi đó sẽ rất khó để đánh giá và tiên lượng về tình trạng sức khỏe của thai nhi. Hiện nay vẫn chưa có khả năng dự báo một cách chính xác về mối liên quan giữa sSMC và hậu quả của nó, nhiều nghiên cứu đang được tiến hành để xác định mối liên hệ giữa sự có mặt của sSMC trong tế bào với các hậu quả trên lâm sàng [18].



Hình 14: Biến dị số lượng bản sao (CNV) trên ADN của nhiễm sắc thể.

Một ưu điểm nhưng lại cũng là một nhược điểm của kỹ thuật array CGH là kỹ thuật này cho phép xác định được các biến dị số lượng bản sao (CNV: copy number variants) của NST[6] (hình 14), loại biến dị này xảy ra khi có một đoạn ADN bị mất đi hoặc nhân lên một hoặc nhiều lần. Mỗi biến dị thuộc loại này có kích thước thay đổi từ 1Kb đến nhiều Mb và chiếm khoảng 12% genome. CNV là một dạng biến dị phổ biến của NST trong quần thể và thường vô hại, số lượng CNV trung bình vô hại ở mỗi cá thể có thể lên tới 800 hoặc hơn [50] tuy nhiên trong một số trường hợp CNV có thể ảnh hưởng đến sự phát triển và sức khỏe của cá thể, CNV được thấy

trong 5 – 18% trẻ chậm phát triển, là nguyên nhân dẫn đến một số dị tật bẩm sinh, sảy thai tự nhiên, thai lưu [25]. Trong một vài trường hợp CNV không liên quan tới tình trạng sức khỏe của bệnh nhân khi còn nhỏ nhưng có thể ảnh hưởng đến sức khỏe của họ trong tương lai. Các CNV làm cho việc đọc kết quả array CGH trở nên khó khăn và trong những trường hợp này cần thiết phải xét nghiệm thêm ADN của bố mẹ để có thể phiên giải kết quả. Vì lý do này mà các array CGH dùng trong chẩn đoán theo mục tiêu (targeted array) được thiết kế để có thể phát hiện tối đa các CNV gây ra những hậu quả bệnh lí và loại trừ các CNV đa hình không liên quan đến các biểu hiện bất thường trên lâm sàng.

Các bất thường NST không thể xác định bằng kỹ thuật array CGH
<p>1. <i>Các trường hợp tái sắp xếp cân bằng của NST (balanced rearrangements)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Chuyển đoạn tương hỗ. – Đảo đoạn – Chuyển đoạn Robertson – Chèn đoạn tương hỗ (reciprocal insertion)
<p>2. <i>Các trường hợp bất thường số lượng của NST (balanced rearrangements)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Đa bội (một số array CGH)
<p>3. <i>Các trường hợp bất thường không cân bằng ở dưới mức phát hiện của kỹ thuật array CGH</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Các đột biến điểm – Thêm hoặc mất đoạn exon có kích thước nhỏ hơn mức độ phân giải của kỹ thuật array CGH. – Gia tăng đoạn lặp ba nucleotid
<p>4. <i>Các trường hợp khảm mức độ thấp</i></p>

Mặc dù việc thực hiện array cho toàn bộ genome cho phép phát hiện các hội chứng mới liên quan đến bất thường của NST nhưng cũng giống như đối với sSMC, trong chẩn đoán trước sinh khi kiểu hình của thai chưa được biết một cách đầy đủ thì khả năng phát hiện các CNV đa hình của array CGH khi thực hiện trên toàn bộ genome làm cho việc phiên giải kết quả hết sức khó khăn so với khi xét nghiệm được thực hiện sau khi sinh.

Các CNV gây ra nhiều khó khăn khi sử dụng array CGH trong chẩn đoán và điều này chỉ được khắc phục khi các kiểu biến dị nói trên được xác định, phân loại và hiểu biết một cách đầy đủ [41].

Một hạn chế nữa của kỹ thuật array CGH là giá xét nghiệm khá cao nên khó có thể thực hiện chỉ định rộng rãi kỹ thuật này cho mọi đối tượng.

KHUYẾN CÁO CỦA HIỆP HỘI DI TRUYỀN Y HỌC HOA KỲ VỀ CHỈ ĐỊNH SỬ DỤNG Array CGH

Hiệp hội Di truyền Y học Hoa Kỳ (ACMG) tháng 11 năm 2010 đã đưa ra các khuyến cáo về chỉ định sử dụng array CGH [23] trong công tác chẩn đoán tuy nhiên các khuyến cáo này chỉ khẳng định giá trị của array CGH trong chẩn đoán sau sinh nhưng không đưa ra những chỉ dẫn cho việc đánh giá trước sinh.

Khuyến cáo của Hiệp hội Di truyền Y học Hoa Kỳ (ACMG) năm 2010 về sử dụng array CGH:

1. Array CGH được chỉ định ưu tiên để phát hiện các biến dị số lượng bản sao (CNV) ở thời điểm sau sinh cho những trường hợp:
 - a. Đa dị tật nhưng không đặc hiệu với những hội chứng di truyền đã biết.
 - b. Các trường hợp chậm phát triển/chậm phát triển tâm thần rõ nhưng không liên quan đến các hội chứng.
 - c. Các rối loạn liên quan đến tự kỷ.
2. Cần xác định thêm về việc sử dụng array CGH trong đánh giá trẻ bị chậm phát triển, chậm nói và một số chỉ định chưa được nghiên cứu đầy đủ đặc biệt đối với các nghiên cứu tiền cứu.
3. Cần có sự theo dõi phù hợp đối với các trường hợp bất thường NST không cân bằng được array CGH phát hiện bao gồm các nghiên cứu về di truyền tế bào học/ FISH trên bệnh nhân, đánh giá bố mẹ của bệnh nhân, tư vấn và đánh giá về di truyền học lâm sàng.

Hướng dẫn này cũng khuyến cáo không nên sử dụng array CGH khi cần có kết quả nhanh chóng như trường hợp nghi ngờ tình trạng thể ba nhiễm vì một số kỹ thuật array CGH cần tới 48 tiếng để thực hiện quá trình lai và có thể cho kết quả trong vòng từ 3 đến 5 ngày nhưng việc phân tích, kiểm định bằng kỹ thuật FISH và phân tích các mẫu ADN của bố mẹ để phiên giải kết quả đòi hỏi phải tiêu tốn nhiều thời gian hơn.

Do giá xét nghiệm cao nên mặc dù array CGH là một công cụ chẩn đoán hiệu quả để đánh giá sự thay đổi về số lượng NST nhưng việc lựa chọn array CGH như là một xét nghiệm ưu tiên trong trường hợp này không phải là một lựa chọn phù hợp vì các trường hợp lệch bội phổ biến như thể ba nhiễm 21, 13, 18, X và Y có thể được phát hiện hiệu quả bằng lập karyotype. Cũng với lý do trên trong trường hợp cần xác định chẩn đoán đối với một số các hội chứng di truyền đã được biết rõ như hội chứng William, FISH sẽ là một lựa chọn thích hợp hơn so với array CGH.

Hiệp hội khuyến cáo không nên chỉ định array CGH trong các trường hợp có kiểu hình bình thường mặc dù tiền sử gia đình có tình trạng tái sắp xếp NST và trong các trường hợp sảy thai liên tiếp.

2.5. SỬ DỤNG Array CGH TRONG CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH

Trong xét nghiệm trước sinh để lập karyotype, tế bào nước ối hoặc tế bào gai nhau phải qua nuôi cấy để có đủ số tế bào cần thiết cho việc phân tích, quy trình này cần thời gian khoảng từ 14 - 21 ngày đây là một khoảng thời gian khá dài và đầy lo âu cho sản

phụ khi chờ đợi kết quả. Đối với việc sử dụng kỹ thuật FISH để phát hiện các bất thường số lượng của các NST 13, 18, 21, X và Y do không cần nuôi cấy tế bào nên chỉ cần khoảng 2 - 3 ngày để có kết quả, tuy nhiên FISH chỉ có thể phát hiện các trường hợp lệch bội phổ biến do đó trong một số trường hợp ngoài FISH vẫn cần phối hợp việc phân tích karyotype. Kỹ thuật array CGH do cũng không đòi hỏi phải nuôi cấy tế bào nên kết quả sẽ được trả trong khoảng từ 3 - 5 ngày[7];[26];[36].

Mặc dù kỹ thuật array CGH hứa hẹn là một xét nghiệm di truyền nhạy hơn, có độ chính xác và tính hiệu quả cao hơn so với các loại xét nghiệm trước sinh khác tuy nhiên bên cạnh đó cũng đặt ra những vấn đề cần phải được giải quyết. Một trong những vấn đề đó là chúng ta thực sự chưa biết một cách đầy đủ về mối tương quan giữa những biến đổi nhỏ trong cấu trúc của NST được phát hiện qua array CGH với sự phát triển bình thường của phôi thai và cơ thể do đó những nỗ lực tìm kiếm những thay đổi của NST trong thai kỳ bằng cách sử dụng array CGH thường quy có thể gây ra những lo âu không đáng có cho sản phụ và gia đình [9], và trong một số trường hợp có thể dẫn đến quyết định đình thai [45]. Việc xác định loại bệnh nào được xem là nghiêm trọng để thực hiện việc chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật CGH cũng là một vấn đề do mức độ nghiêm trọng của bệnh được cảm nhận rất khác nhau và phụ thuộc vào khả năng điều trị [54];[9].

Căn cứ trên chức năng của việc chẩn đoán trước sinh là (1) hỗ trợ cho những thai kỳ có nguy cơ cao, (2) cung cấp đầy đủ thông tin cho bố mẹ để có thể quyết định hướng giải quyết và (3) cung cấp thông tin để bố mẹ có chuẩn bị tốt cho việc chăm sóc trẻ bị khuyết tật hoặc các vấn đề về sức khỏe khác sau khi sinh đã có nhiều ý kiến tranh cãi về vai trò của array CGH trong giai đoạn trước sinh, tuy nhiên đa số đồng ý về tính hiệu quả của array CGH trong chẩn đoán trước sinh nhưng khuyến cáo các nhà lâm sàng cần lưu ý đến những hạn chế của kỹ thuật này [8];[2];[37];[48].

Các mẫu xét nghiệm trước sinh sử dụng trong kỹ thuật array CGH để chẩn đoán có thể là (1) các mẫu lấy từ thai lưu hoặc thai sẩy ngẫu nhiên [39], (2) các mẫu tế bào ối và tế bào gai nhau qua nuôi cấy hoặc không qua nuôi cấy [35], (3) các ADN tự do của thai (cell free fetal DNA) có trong dịch ối [31];[30] (4) các mẫu lấy từ các thai đa di tật[16].

Array CGH được chỉ định trong chẩn đoán trước sinh trong các trường hợp:

- Thai nhi được phát hiện có bất thường cấu trúc qua siêu âm [20];[51];[40],
- Các trường hợp cần phân tích sâu hơn các bất thường của NST của thai nhi [10];[38];[51]: Array CGH cho phép phát hiện thêm 3,6% các trường hợp bất thường không cân bằng trong genome trong số các trường hợp lập karyotype không phát hiện được bất thường nào cả. Kỹ thuật này cũng làm tăng tỷ lệ phát hiện lên 5,2% so với việc lập karyotype khi có chỉ định do siêu âm phát hiện bất thường cấu trúc của thai nhi [20].
- Tiền sử đã sinh con bị bất thường NST.
- Bố mẹ mang bất thường dạng cân bằng của NST.

- Trường hợp tuổi mẹ cao [27]: nhiều nghiên cứu cho thấy ở sản phụ ở độ tuổi cao 70% phôi và 50% túi phôi (blastocyte) mang bất thường NST. Những bất thường này làm giảm khả năng làm tổ và tăng khả năng sảy thai theo sự gia tăng của tuổi mẹ. Ngoài ra array CGH là một kỹ thuật hiệu quả cho việc đánh giá bộ NST của các tế bào phôi trong điều trị vô sinh.

Chỉ định kỹ thuật array CGH trong chẩn đoán trước sinh
<ul style="list-style-type: none"> - Có dấu hiệu bất thường của thai nhi trên siêu âm - Nghi ngờ mang chuyển đoạn không cân bằng - Tiền sử đã sinh con bị bất thường NST - Bố mẹ mang bất thường NST dạng cân bằng - Tuổi mẹ cao

Hiện nay vấn đề ứng dụng kỹ thuật array CGH cũng như giá trị của nó trong chẩn đoán trước sinh vẫn còn đang được tiếp tục thảo luận. Việc sử dụng array CGH có mục tiêu (targeted array CGH) được đề xuất sử dụng trong chẩn đoán trước sinh để làm tăng khả năng phát hiện các bất thường NST [44] tuy nhiên việc chẩn đoán dựa trên các mục tiêu định sẵn như vậy cũng sẽ dẫn đến bỏ sót một số trường hợp bất thường không cân bằng của NST mà những bất thường này có thể dẫn đến những bất thường về mặt lâm sàng [48], đây là một hạn chế giống như những hạn chế của các kỹ thuật chẩn đoán trước sinh khác mặc dù ở mức độ nhỏ hơn.

Hội Sản Phụ Khoa Hoa Kỳ [1] (ACOG: American Congress of Obstetricians and Gynecologists) tháng 11 năm 2009 đã đưa ra nhận định về kỹ thuật array CGH sử dụng trong chẩn đoán trước sinh như sau:

- Kỹ thuật array CGH thuận lợi hơn so với kỹ thuật lập karyotype truyền thống trong chẩn đoán trước sinh trong đánh giá các trường hợp có bất thường với độ phân giải cao, không cần phải nuôi cấy tế bào ối hoặc gai nhau, tự động hóa và cho kết quả trong thời gian ngắn hơn.
- Kỹ thuật array CGH không thể phát hiện các trường hợp đảo đoạn hoặc chuyển đoạn cân bằng cũng như trường hợp tam bội.
- Giá xét nghiệm cao.
- Array CGH phát hiện một lượng lớn CNV vô hại hoặc các CNV không chắc có thể gây ra các biểu hiện lâm sàng không rõ ràng.
- Array CGH không thể phát hiện các trường hợp khảm có tỷ lệ khảm dưới 20%.

Hội Sản Phụ Khoa Hoa Kỳ cũng đưa ra những ý kiến về sử dụng kỹ thuật array trong chẩn đoán trước sinh như sau :

- Kỹ thuật lập karyotype truyền thống vẫn là kỹ thuật di truyền tế bào học cơ bản sử dụng trong chẩn đoán trước sinh.

- Kỹ thuật array CGH có mục tiêu (targeted array CGH), phối hợp với tư vấn di truyền, có thể được chỉ định trong chẩn đoán trước sinh như là biện pháp bổ sung cho các trường hợp thấy có bất thường về giải phẫu của thai nhi và karyotype bình thường cũng như các trường hợp thai chết với các dị dạng bẩm sinh và không thể lập được karyotype.
- Các cặp vợ chồng chọn kỹ thuật array CGH có mục tiêu cần nhận được tư vấn di truyền trước và sau khi thực hiện array CGH. Để phân giải các kết quả của array CGH cần có hỗ trợ tư vấn di truyền lâu dài.
- Các cặp vợ chồng này cần phải hiểu rằng kỹ thuật array CGH không thể phát hiện được tất cả các bệnh lý di truyền và các kết quả của array CGH có thể khó phân giải.
- Kỹ thuật array CGH có mục tiêu có thể hữu ích ở vai trò như một công cụ sàng lọc, cần phải có nhiều nghiên cứu thêm để xác định một cách đầy đủ về khả năng cũng như hạn chế của nó.

2.6. NGÂN HÀNG DỮ LIỆU

Hiện nay một hiệp hội quốc tế với sự liên kết của hơn 75 phòng thí nghiệm trên thế giới đã được thành lập để tập trung giải quyết các vấn đề liên quan đến kỹ thuật array với tên gọi là “The International Standard Cytogenomic Array Consortium” (<https://www.iscaconsortium.org/>). Hiệp hội đang nghiên cứu tính khả thi của việc thành lập một hệ thống thống nhất, được tiêu chuẩn hóa trong báo cáo và phân loại các kết quả của array CGH cả trường hợp bệnh lý lẫn trường hợp vô hại, để cung cấp cho các nhà lâm sàng các thông tin chính xác nhất và luôn được cập nhật [25].

Ngân hàng dữ liệu để tham khảo vị trí và chức năng của gen, danh sách của các CNV, thông tin cập nhật các biểu hiện lâm sàng cho các trường hợp bất thường đặc hiệu hiện đã sẵn có trên các trang web của:

- UC Santa Cruz Database (<http://www.genome.uscs.edu>)
- Toronto Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>)
- DECIPHER (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decip>),
- ECARUCA (<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>)

3. KẾT LUẬN

Với kỹ thuật array CGH hiện nay có thể đi đến một số kết luận sau:

- Array CGH không chỉ cho phép phát hiện các trường hợp bất thường không cân bằng như kỹ thuật lập karyotype mà còn cho phép phát hiện các trường hợp bất thường không cân bằng của NST ở dưới mức hiển vi mà kỹ thuật này không thể phát hiện được.

- Array CGH hiện đã được sử dụng trong chẩn đoán trước sinh, đặc biệt đối với những trường hợp thai nhi được siêu âm phát hiện mắc các dị tật về cấu trúc.
- Mặc dù có tính ưu việt hơn hẳn các kỹ thuật phân tích NST truyền thống nhưng array CGH vẫn còn tồn tại một số giới hạn do đó bên cạnh việc tiếp tục nghiên cứu để khắc phục những giới hạn đó, tư vấn di truyền là hết sức cần thiết cho các trường hợp được chỉ định array CGH trước sinh.
- Cần có thêm nhiều nghiên cứu để xác định phạm vi chỉ định sử dụng array CGH trong thai kỳ và thiết kế kỹ thuật array CGH tối ưu dùng trong chẩn đoán trước sinh.

PHỤ LỤC

1. **Phòng Xét nghiệm Di truyền Y học của Đại học Y khoa Baylor, Texas, Hoa kỳ:** đã đưa array CGH vào chẩn đoán trước sinh với các đoạn dò oligo với kích thước trung bình là 30Kb phủ tất cả các vị trí có liên quan đến khoảng 140 bệnh lý di truyền trên genome, bao gồm tất cả các hội chứng liên quan đến vi nhân đoạn và vi mất đoạn đã biết, cũng như các vùng quanh tâm động (pericentromere) và cận đầu tận cùng (subtelomere) và được chỉ định cho các trường hợp thai kỳ có nguy cơ mắc các bệnh lý di truyền với chi phí khoảng 1600 USD mỗi xét nghiệm với thời gian thực hiện xét nghiệm khoảng từ 5 – 9 ngày. Để biết thêm về các trường hợp bệnh lý có thể được phát hiện bằng array CGH của Baylor xin vào trang web: *Trang web tham khảo:* <http://www.bcm.edu/geneticlabs/>
2. **Phòng xét nghiệm Signature genomics, Washington, Hoa kỳ:** phát triển con Chip chẩn đoán trước sinh với kỹ thuật array CGH sử dụng các dòng BAC tại những vị trí đặc hiệu liên quan đến 100 hội chứng di truyền đã được ghi nhận, các vùng cận đầu tận cùng và các vùng quanh tâm động. Kỹ thuật array CGH phối hợp với việc lập karyotype của thai nhi được chỉ định cho những sản phụ có kết quả siêu âm cho thấy có bất thường của thai nhi, các trường hợp có bất thường trên karyotype đòi hỏi cần phải làm rõ thêm bằng các kỹ thuật phân tử, có tiền sử các thai kì trước đó bị đa dị tật không rõ căn nguyên, tiền sử sảy thai liên tiếp hoặc thai lưu không rõ nguyên nhân, tuổi mẹ cao, có kết quả sàng lọc huyết thanh của mẹ bất thường cả những chỉ định khác cho việc phân tích NST. Chi phí cho mỗi xét nghiệm là 1550 USD và thời gian trả xét nghiệm khoảng 5 ngày cho kỹ thuật array CGH. Để biết thêm về các trường hợp bệnh lý có thể được phát hiện bằng array CGH của Signature Genomics xin vào trang web: <http://www.signaturegenomics.com/>
3. **Phòng xét nghiệm Gene Dx, Hoa kỳ:** phát triển kỹ thuật array CGH sử dụng khoảng 60.000 oligonucleotit, cho phép phát hiện khoảng 100 hội chứng vi nhân đoạn, vi mất đoạn, các trường hợp tái sắp xếp vùng cận đầu tận cùng của NST, các trường hợp lệch bội, và bất kỳ trường hợp mất cân bằng nào của genome lớn hơn 1Mb. Chi phí cho mỗi xét nghiệm là 1995 USD. Để biết thêm về các trường hợp bệnh lý có thể được phát hiện bằng array CGH của Gene Dx xin vào trang web: <http://www.genedx.com>

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. ACOG Committee Opinion No. 446. (2009) array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis *Obstet Gynecol.* Nov;114(5):1161-3.
2. Baris H.N., Tan W., Kimonis V.E., Irons M. (2007). Diagnostic utility of arraybased comparative genomic hybridization in a clinical setting. *Am J Med Genet A* 143A:2523-2533.
3. Bejjani B.A., Saleki R., Ballif B.C., Rorem E.A., Sundin K. (2005). Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: Is less more? *Am J Med Genet A* 134:259-267.
4. Chi B., deLeeuw R., Coe B., MacAulay C., Lam W. (2004). SeeGH-A software tool for visualization of whole genome array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics* 5:13-19.
5. Cirigliano V., Voglino G., Canadas M.P., Marongiu A., Ejarque M., Ordonez E., Plaja A., Massobrio M., Todros T., Fuster C., Campogrande M., Egozcue J., Adinolfi M. (2004). Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment of 18,000 consecutive clinical samples. *Molecular Human Reproduction* 110:839-846.
6. Conrad D. F. et al. (2010) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464, 704–712
7. Fiegler H., Geigl J., Langer S., Rigler D., Porter K., Unger K., Carter N., Speicher M. (2007). High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Research* 35:1-10.
8. Ghosh K. (2007). Microarray genetic screening: the other side of the coin. *Lancet* 369:992-993.
9. Grody W.W. (2003) Ethical Issues Raised by Genetic Testing with Oligonucleotide Microarrays. *Molecular Biotechnology* 23:127-138.
10. Hillman C., Pretlove S., Coomarasamy A., McMullan D., Davison E.V., Maher E., Kilby M.D. (2011) Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 37(1):6-14.
11. Kim S., Nam S., Lee S., Park W., Yoo N., Lee J., Chung Y. (2005). ArrayCyGHT: a web application for analysis and visualization of array-CGH data. *Bioinformatics* 21:2554-2555.
12. Kirchhoff M., Rose H., Lundsteen C. (2001) High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 38:740-744.
13. Knight, S.J., Flint J. (2004). The use of subtelomeric probes to study mental retardation. *Methods Cell Biol* 75:799-831.
14. Knuutila S., Bjorkqvist A.M., Autio K., Tarkkanen M., Wolf M., Monni O., Szymanska J., Larramendy M., Tapper J., Pere H., El-Rifai W., Hemmer S., Wasenius V.M., Vidgren V. (1998). DNA copy number amplifications in human neoplasms: A review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 152:1107-1123.
15. Kozlowski P., Grund I., Hickmann G., Stressig R., Knippel A.J. (2006) Quantitative fluorescent polymerase chain reaction versus cytogenetics: risk-related indication and clinical implementation of nondetected chromosomal disorders. *Fetal Diagn. Ther* 21:217-223.
16. Le Caignec C., Boceno M., Saugier-veber P., Jacquemont S., Joubert M., David A., Frebourg T., Rival J.M. (2005) Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet*;42:121–128.
17. Liehr et al. (2004) Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Research*; 107: 55-67
18. Liehr et al (2006) Small supernumerary marker chromosomes--progress towards a genotype-phenotype correlation. *Cytogenet Genome Res.* 112:23-34.
19. Ligon A.H., Beaudet A.L., Shaffer S.G. (1997). Simultaneous multilocus FISH analysis for detection of microdeletions in the diagnostic evaluation of developmental delay and mental retardation. *Am J Hum Genet* 61:51-59.
20. Linda K., Diana W.B., Lisa G.S., Emily R., Janet C., Sabrina D.C., Hocine T., Louise E. W.H. (2009) Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenatal Diagnosis* .Vol 29, Issue 13,1213-1217.
21. Lu X, Shaw CA, Patel A, et al. (2007) Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One*; 2: e327.
21. 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.
23. Melanie M.;Louanne H.(2010) Array-based technology and recommendations for utilization in

- medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. ACMG practice guidelines (2010). *Genetics IN Medicine* . Vol 12 (11), 742-745
24. *Microarray Technology in Practice* (2009). Logarithmic Ratio Transformations. 146 - 152
 25. Miller DT, Adam MP, Aradhya S. (2010) Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*; 86: 749–764.
 26. Miura S., Miura K., Masuzaki H., Miyake N., Yoshiura K., Sosonkina N., Harada N., Shimokawa N., Harada. N., Shimokawa. O., Nakayama. D., Yoshimura S., Matsumoto N., Niikawa N., Ishimaru T. 2006. Microarray comparative genomic hybridization (CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid. *J Hum Genet* 51:412-417.
 27. Munne S., Wagner C., Coll P., Wiemer K., Fischer J., Hill D. , Kaplan B., Danzer H. , Surrey M., Opsahl M.. (2010) First Clinical Results with Preimplantation Genetic Diagnosis Using Array Comparative Genome Hybridization. *Fertility and Sterility*. Vol 93(5), Supplement , Page S7.
 28. Nielsen J., Wohler M., Faaborg-Andersen J., Hansen K. B., Hvidman L., Krag-Olsen B., Moulvad I., Videbech P. (1982) Incidence of Chromosome Abnormalities in Newborn Children. Comparison Between Incidences in 1969-1974 and 1980-1982 in the Same Area. *Hum Genet* 61:98-101.
 29. Ochshorn Y., Bar-Shira A., Jonish A., Yaron Y.(2006). Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy for chromosomes 21, 18, 13, and X by quantitative fluorescence polymerase chain reaction. *Fetal Diagn Ther* 21:326-331.
 30. Olav L., Xin-Yan L., Kirby L.J., Zina J., Helene S., Janet M.C., Umadevi T., Diana W.B.(2007) Array-CGH analysis of cell-free fetal DNA in 10 mL of amniotic fluid supernatant. *Prenatal Diagnosis*. Vol 27(7), 616–621.
 31. Paige B. L., Kirby L. J., Ekaterina P., Madhuri L., Kim W., Erik S L., Umadevi T., Janet M. C., Diana W.B. (2004) Microarray Analysis of Cell-Free Fetal DNA in Amniotic Fluid: a Prenatal Molecular Karyotype. *Am J Hum Genet*. 75(3): 485–491.
 32. Pertl B., Kopp S., Kroisel P.M., Tului L., Brambati B., Adinolfi M. (1999). Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet* 36:300-303
 33. Pinkel D., Seagraves R., Sudar D., Clark S., Poole I., Kowbel D., Collins C., Kuo W.L., Chen C., Zhai Y., Dairkee S.H., Ljung B.M. Gray J.W. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211.
 34. Rauch A, Hoyer J, Guth S, et al. (2006) Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet*;140:2063–2074
 35. Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R, Cirigliano V, Voglino G, Ng B L, Scott C, Whittaker J, Adinolfi M, Carter N P, Bobrow M. (2006) Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. *J Med Genet*. April; 43(4): 353–361.
 36. Rickman L., Fiegler H., Carter N.P., Bobrow M. (2005). Prenatal Diagnosis by Array-CGH. *European Journal of Medical Genetics* 48:232-240.
 37. Roa B.B., Pulliam J., Eng C.M., Cheung S. (2005). Evolution of prenatal genetics: from point mutation testing to chromosomal microarray analysis. *Expert Rev Mol Diagn* 5:883-892.
 38. Savage MS, Mourad MJ, Wapner RJ. (2011) Evolving applications of microarray analysis in prenatal diagnosis. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. Vol 23(2):103-108.
 39. Schaeffer AJ, Chung J et al. (2004) Comparative genomic hybridization- array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet*; 74: 1168-74.
 40. Schou KV, Kirchhoff M, Nygaard U, Jørgensen C, Sundberg K. (2009) Increased nuchal translucency with normal karyotype: a follow-up study of 100 cases supplemented with CGH and MLPA analyses. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 34(6):618-22.
 41. Sebat J., Lakshmi B., Troge J. et al. (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525-528.
 42. Shaffer L., Bejjani B. (2004) A cytogeneticist’s perspective on genomic microarrays. *Human Reproduction* 10:221-226.
 43. Shaffer L., Bejjani B. (2006). Medical applications of array-CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogen Genome Res* 115:303-309.

44. Shaffer L.G., Bui T.H. (2007). Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 145:87-89.
45. Shuster E. (2007). Microarray genetic screening: a prenatal roadblock for life? *Lancet* 369:526-529.
46. Snijders A.M., Nowak N., Seagraves R., Blackwood S., Brown N., Conroy J., Hamilton G., Hindle A.K., Huey B., Kimura K., Law S., Myambo K., Palmer J., Yitra B., Yue J.P., Gray J.W., Jain A.N., Pinkel D., Albertson D.G. (2001) Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29:263-264.
47. Solinas-Toldo S., Lampel S., Stilgenauer S., Nickolenko J., Benner A., Dohner H., Cremer T., Lichter P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399- 407.
48. South S., Chen Z., Brothman A. (2008). Genomic Medicine in Prenatal Diagnosis. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 51:62-73.
49. Speicher M.R., Gwyn Ballard S., Ward D.C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12:368-375
50. Tyson C, Harvard C, Locker R et al. (2005) Submicroscopic deletions and duplications in individuals with intellectual disability detected by array-CGH. *Am J Med Genet*;139:173–185.
51. Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang SH, Simovich MJ, Ward PA, Darilek S, Johnson A, Neill SE, Bi W, White LD, Eng CM, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet AL. (2009) Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn.* 29(1):29-39.
52. Ward B.E., Gersen S.L., Carelli M.P., McGuire N.M., Dackowski W.R., Weinstein M., Sandlin C., Warren R., Klinger K.W. (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.
53. Wicker N., Carles A., Mills I.G., Wolf M., Veerakumarasivam A., Edgren H., Boileau F., Wasyluk B., Schalkens J.A., Neal D., Kallioniemi O., Poch O. (2007). A new look towards BAC-based array CGH through a comprehensive comparison with oligo-based array CGH. *BMC Genomics* 8:84-94.
54. Wilckens B. (2003). Ethical issues in newborn screening and the impact of new technologies. *Eur J Pediatr* 162:S62-S66.
55. Xiang B, Li A, Valentin D. et al. (2008) Analytical and clinical validity of wholegenome oligonucleotide array comparative genomic hybridization for pediatric patients with mental retardation and developmental delay. *Am J Med Genet A*;146A:1942–1954.
56. Yitra B., van den IJssel P., Carvalho B., Brakenhoff R., Meijer G. (2006). BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array-CGH). *Nucleic Acids Research* 34:445-450.