

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI (NGS) NHẪM ĐÍCH GEN *CPT1A* TRÊN MẪU MÁU KHÔ CỦA BỆNH NHÂN NGHI NGỜ THIỂU HỤT CARNITINE PALMITOYLTRANSFERASE 1A TẠI VIỆT NAM

Tạ Văn Thọ^{1,✉}, Trần Thị Chi Mai¹, Đặng Thị Thanh Mai²

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Châm cứu Trung ương

Thiếu hụt carnitine palmitoyltransferase 1A (*CPT1A* deficiency) là rối loạn oxy hóa acid béo bẩm sinh hiếm gặp, đặc trưng bởi tăng carnitine tự do (C0) và giảm acylcarnitine chuỗi dài (C16, C18). Nghiên cứu nhằm hoàn thiện quy trình giải trình tự gen thể hệ mới (NGS) nhắm đích trên gen *CPT1A* và xác định đột biến gây bệnh ở bệnh nhi có kết quả sàng lọc sơ sinh nghi ngờ. Hai mươi mốt cặp mỗi bao phủ toàn bộ vùng mã hóa của gen *CPT1A* được thiết kế và thẩm định. Phản ứng PCR được thực hiện trên mẫu máu khô và mẫu chứng, sau đó tiến hành giải trình tự trên nền tảng DNBSEQ-G200. Kết quả NGS đạt chất lượng vượt chuẩn lâm sàng với %Q30 = 84,5%, tổng số đọc 14,65 triệu, tỷ lệ trùng lặp 9,8%, độ sâu trung bình 127,77 - 6.932,05x và độ bao phủ $\geq 20\times$ đạt 100%. Trên mẫu bệnh nhi nghi ngờ phát hiện 9 biến thể dị hợp tử, tất cả đều được phân loại là lành tính theo ClinVar và gnomAD. Mặc dù hồ sơ acylcarnitine gợi ý mạnh thiếu hụt *CPT1A*, nghiên cứu chưa ghi nhận biến thể gây bệnh, cho thấy sự cần thiết phải kết hợp đa phương pháp và mở rộng nghiên cứu trên quần thể lớn hơn.

Từ khóa: Thiếu hụt *CPT1A*, gen *CPT1A*, giải trình tự thể hệ mới (NGS), rối loạn oxy hóa acid béo, sàng lọc sơ sinh.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rối loạn oxy hóa acid béo (Fatty Acid Oxidation Disorders - FAODs) là nhóm bệnh chuyển hóa bẩm sinh hiếm gặp, gây thiếu năng lượng nghiêm trọng trong giai đoạn stress chuyển hóa do khiếm khuyết β -oxy hóa acid béo tại ty thể.¹ Thiếu hụt carnitine palmitoyltransferase 1A (*CPT1A* deficiency, OMIM #255120) là một dạng FAODs do đột biến gen *CPT1A* (OMIM #600528), di truyền lặn nhiễm sắc thể thường, với biểu hiện lâm sàng nặng bao gồm hạ đường huyết không keton, tăng ammoniac máu, suy gan cấp và nguy cơ tử vong cao ở trẻ sơ sinh nếu không được chẩn đoán sớm.^{2,3}

Sàng lọc sơ sinh mở rộng bằng tandem mass spectrometry (MS/MS) phát hiện bất thường acylcarnitine profile (tăng mạnh carnitine tự do - C0, giảm acylcarnitine chuỗi dài C16/C18, tỷ lệ C0/(C16+C18) rất cao) là phương pháp hiệu quả để phát hiện sớm *CPT1A* deficiency, giúp cải thiện đáng kể tiên lượng bệnh.^{1,4} Tại Việt Nam, dù chương trình sàng lọc sơ sinh đang được mở rộng, chẩn đoán xác định vẫn chủ yếu dựa vào MS/MS và lâm sàng, dễ gặp dương tính giả hoặc khó phân biệt với các FAODs khác (*CPT2* deficiency, *CACT* deficiency, *VLCAD* deficiency).⁵

Giải trình tự gen thể hệ mới (NGS) là tiêu chuẩn vàng để xác định đột biến gây bệnh, cho phép chẩn đoán chính xác, phân biệt bệnh và hỗ trợ tư vấn di truyền.^{2,6} Việc thẩm định quy trình NGS theo hướng dẫn ACMG/AMP

Tác giả liên hệ: Tạ Văn Thọ

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tavanthao@gmail.com

Ngày nhận: 15/12/2025

Ngày được chấp nhận: 05/02/2026

(variant classification) và AMP/CAP (technical standards cho germline NGS) là bắt buộc để đảm bảo độ tin cậy lâm sàng.^{6,7} Tuy nhiên, tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào thẩm định quy trình targeted NGS cho gen CPT1A trên các trường hợp MS/MS nghi ngờ.

Nghiên cứu này nhằm thẩm định quy trình amplicon-based targeted NGS phân tích toàn bộ exon gen CPT1A theo tiêu chuẩn ACMG/AMP và AMP/CAP, đồng thời áp dụng trên bệnh nhi có kết quả sàng lọc MS/MS điển hình nghi ngờ CPT1A deficiency, góp phần xây dựng công cụ chẩn đoán di truyền đáng tin cậy cho rối loạn này tại Việt Nam.

Mục tiêu nghiên cứu

(1) Hoàn thiện và thẩm định quy trình targeted NGS phân tích gen CPT1A theo tiêu chuẩn ACMG/AMP và AMP/CAP;

(2) Xác định các biến thể gen CPT1A trên bệnh nhi có kết quả sàng lọc sơ sinh nghi ngờ

CPT1A deficiency.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Nghiên cứu thực hiện trên một mẫu máu khô trên giấy thấm Whatman 903 (Dried Blood Spot - DBS) của bệnh nhi sơ sinh (mã mẫu S01), thu thập trong chương trình sàng lọc sơ sinh mở rộng rối loạn chuyển hóa bẩm sinh bằng tandem mass spectrometry (MS/MS) tại Trung tâm Xét nghiệm Chemedic Việt Nam. Mẫu này có acylcarnitine profile điển hình nghi ngờ thiếu hụt carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A deficiency), với carnitine tự do (C0) tăng rất cao 207,67 $\mu\text{mol/L}$ (ngưỡng cắt > 59 $\mu\text{mol/L}$), acylcarnitine chuỗi dài C16, C18 và C18:1 giảm rõ rệt, tỷ số C0/(C16+C18) \approx 407 (giá trị ngưỡng gợi ý mạnh CPT1A deficiency theo hướng dẫn sàng lọc quốc tế.^{1,4} Các acylcarnitine chuỗi ngắn và trung bình nằm trong giới hạn bình thường (**Bảng 1**).

Bảng 1. Acylcarnitine profile bằng MS/MS của mẫu nghiên cứu (S01)

Xét nghiệm	Kết quả ($\mu\text{mol/L}$)	Khoảng tham chiếu ($\mu\text{mol/L}$)	Nhận xét
Free carnitine (C0)	207,67	8,5 - 59	Tăng rất cao
Hexadecanoylcarnitine (C16)	0,32	0,48 - 6,0	Giảm
Octadecanoylcarnitine (C18)	0,19	0,24 - 1,7	Giảm
Octadecenoylcarnitine (C18:1)	0,25	0,42 - 2,5	Giảm
C0/(C16+C18)	407	< 100	Tăng rất cao

Mẫu chứng: DNA genomic tinh sạch (không mang biến thể CPT1A, đã xác nhận bằng NGS trước đó) do Công ty CP Chemedic Việt Nam cung cấp

Tiêu chuẩn chọn mẫu

Kết quả MS/MS nghi ngờ CPT1A deficiency (C0 > 59 $\mu\text{mol/L}$ và/hoặc C0/(C16+C18) tăng cao kèm giảm C16, C18); mẫu DBS đủ thể tích, bảo quản đúng quy trình (-20°C).

Tiêu chuẩn loại trừ

Mẫu chất lượng kém, thiếu thông tin lâm sàng hoặc acylcarnitine profile gợi ý rối loạn oxy hóa acid béo khác.

Trong thời gian nghiên cứu chỉ ghi nhận duy nhất 01 mẫu đáp ứng tiêu chuẩn.

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm phòng thí nghiệm, mô tả cắt ngang nhằm thẩm định và ứng dụng quy trình targeted amplicon-based NGS phân tích gen *CPT1A*.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện tại Phòng Nghiên cứu và Phát triển - Công ty CP Chemedic Việt Nam và Bộ môn Hóa sinh Lâm sàng, Khoa Kỹ thuật Y học - Đại học Y Hà Nội, từ tháng 08/2024 đến tháng 10/2025.

Thiết bị và hóa chất

Thiết bị chính được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

Tên thiết bị	Xuất xứ/Nhà cung cấp
Máy ly tâm	Thermo Fisher, Mỹ
Máy lắc vortex	Velp, Ý
Máy quang phổ UV/Vis Nano Spectrophotometer	Nabi, Hàn Quốc
Máy Real-time PCR DT-96	DNA-Technology, Nga
Hệ thống điện di nanoPAC-300	Cleaver Scientific, Anh
Máy soi gel UV	Nhật Bản
Pipet bán tự động các loại	Thermo Fisher, Anh
Máy giải trình tự DNBSEQ-G200	MGI Tech, Trung Quốc
Hệ thống máy chủ phân tích dữ liệu NGS	ACER, Đài Loan

Hóa chất chính

Kit tách chiết DNA từ máu khô: QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany). MasterMix PCR: GoTaq Green Master Mix (Promega, Mỹ). Hóa chất điện di: Agarose (Cleaver Scientific, Anh), RedSafe Nucleic Acid Staining Solution 20,000X (Cleaver Scientific, Anh), TAE 50X (Norgen Biotek, Canada), DNA Ladder 100 bp (Cleaver Scientific, Anh). Kit chuẩn bị thư viện NGS và sequencing: MGIEasy Fast PCR-FREE Fragment Library Prep Set và DNBSEQ-G200 sequencing kit (MGI Tech, Trung Quốc). 21 cặp mỗi đặc hiệu bao phủ toàn bộ 19 exon và vùng ranh giới exon-intron gen *CPT1A* (thiết kế bằng phần mềm UGENE, tổng hợp tại Phusa Genomics, Việt Nam, lần lượt 1.1, 1.2, 1.3, 4-19).⁸

Quy trình chi tiết

- Tách chiết DNA Thực hiện từ 3 đĩa giấy

máu khô đường kính 3 mm bằng QIAamp DNA Blood Mini Kit theo protocol nhà sản xuất (Qiagen). Nồng độ và độ tinh sạch DNA đánh giá bằng NanoDrop (A260/280 ratio 1,7 - 2,2 được chấp nhận).

- Phản ứng PCR khuếch đại 21 amplicon Thành phần phản ứng (tổng 20 μ L), gồm: GoTaq Green Master Mix 2X (10 μ L), mỗi (primer, 5 μ L), DNA khuôn (5 μ L).

Chu trình nhiệt trên máy DT-96:

+ Biến tính ban đầu: 95°C - 5 phút.

+ 40 chu kỳ: 95°C - 30 giây, 55°C - 30 giây, 72°C - 30 giây (riêng cặp mỗi 1.1; 1.2; 1.3 kéo dài 72°C - 1 phút).

+ Kéo dài cuối: 72°C - 5 phút.

Sản phẩm PCR kiểm tra trên gel agarose 2% (130 V, 33 phút), soi UV.

- Giải trình tự NGS Thực hiện targeted sequencing (sản phẩm PCR, amplicon) bằng công nghệ DNBSEQ-G200 (MGI Tech). Thư viện được chuẩn bị từ pool sản phẩm PCR của 21 amplicon theo kit MGIEasy Fast PCR-FREE. Sequencing mục tiêu ≥ 1 triệu reads/mẫu.

Pipeline sinh tin (tuân thủ nghiêm ngặt khuyến cáo AMP/CAP cho bioinformatics validation của NGS germline [8]): (1) Kiểm soát chất lượng FASTQ: FastQC v1.0; (2)

Alignment lên genome tham chiếu GRCh38: BWA-MEM; (3) Đánh dấu và loại bỏ duplicate: Picard MarkDuplicates v2.27; (4) Gọi biến thể: GATK HaplotypeCaller v4.2 theo best practices germline SNV/InDel; and (5) Chú giải và phân loại biến thể: ClinVar, gnomAD, dbSNP; phân loại theo tiêu chuẩn ACMG/AMP 2015.⁷

Các ngưỡng chất lượng QC nghiêm ngặt theo AMP/CAP được trình bày trong **Bảng 3**.

Bảng 3. Tiêu chuẩn đánh giá chất lượng dữ liệu NGS (theo AMP/CAP)

Chỉ số	Ngưỡng chấp nhận	Công cụ
%Q30	$\geq 80\%$	FastQC
Total reads	≥ 1 triệu/sample	FastQC
Mapping rate	$\geq 95\%$	BWA-MEM
On-target rate	$\geq 80\%$	Picard
Duplication rate	$< 15\%$	Picard
Mean depth	$\geq 100\times$	GATK
Coverage $\geq 20\times$	$\geq 95\%$	GATK
QUAL	≥ 20	GATK
DP tại biến thể	≥ 20	GATK
GQ	≥ 20	GATK

Xử lý số liệu

Dữ liệu được xử lý bằng Excel 365 và phần mềm chuyên dụng NGS (MegSAP, DRAGEN Bio-IT Platform).

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu chỉ sử dụng mẫu thừa từ sàng lọc sơ sinh, không thu thập thêm thông tin nhận dạng bệnh nhân, thực hiện vì mục đích khoa học và cải thiện chẩn đoán, tuân thủ nghiêm ngặt nguyên tắc Helsinki và quy định nghiên

cứu y sinh Việt Nam.

III. KẾT QUẢ

1. Chất lượng DNA và sản phẩm PCR

DNA tách chiết từ máu khô đạt nồng độ 8,0 ng/ μ L, A260/280 = 1,77. Điện di 21 amplicon cho băng rõ nét, kích thước đúng lý thuyết, không có băng phụ (**Hình 1**). Kết quả cho thấy DNA từ DBS đủ chất lượng cho khuếch đại đa mồi và NGS.



Hình 1. Kết quả điện di

2. Chất lượng dữ liệu NGS

Bảng 4. Các chỉ số chất lượng NGS mẫu S01

Chỉ số	Giá trị đạt được	Ngưỡng chấp nhận (AMP/CAP)	Đánh giá
%Q30	84,5%	≥ 80%	Đạt
Total reads	14,65 triệu	≥ 1 triệu	Đạt
Mapping rate	99,8%	≥ 95%	Đạt
On-target rate	98,7%	≥ 80%	Đạt
Duplication rate	9,8%	< 15%	Đạt
Mean depth (toàn gen)	2.847×	≥ 100×	Đạt
Coverage ≥ 20×	100%	≥ 95%	Đạt
Coverage ≥ 30×	99,8%	≥ 90%	Đạt

Độ sâu trung bình giữa các exon dao động từ 127,77× đến 6932,05×, đảm bảo tất cả exon đạt độ bao phủ ≥ 20×.

3. Biến thể phát hiện

Bảng 5. Danh sách 9 biến thể được phát hiện (tất cả dị hợp tử)

rsID	Vị trí (GRCh38)	Biến thể	Loại biến thể	DP	AF (gnomAD)	ClinVar
rs2924699	chr11:68835726	C>T	Intron variant	2384	0,07 - 0,13	Benign
rs2305507	chr11:68841372	C>A	Splice region variant	259	0,32	Benign
rs75677837	chr11:68855790	A>G	Intron variant	2348	0,008	Benign
rs61887062	chr11:68860321	G>A	Intron variant	1770	0,04	Benign
rs61887063	chr11:68860345	C>T	Intron variant	124	0,04	Benign
rs61887064	chr11:68860389	A>G	Intron variant	1519	0,04	Benign

rsID	Vị trí (GRCh38)	Biến thể	Loại biến thể	DP	AF (gnomAD)	ClinVar
rs3019603	chr11:68861235	A>C	Splice polypyrimidine tract variant	1519	0,32	Benign
rs3019576	chr11:68865123	A>T	Downstream gene variant	1519	0,91 - 0,94	Benign
rs2228502	chr11:68864987	G>A	Synonymous variant	1521	> 0,91	Benign

Note:

DP (Depth): độ sâu đọc tại vị trí biến thể, phản ánh số lần nucleotide được giải trình tự; theo tiêu chuẩn AMP/CAP, DP ≥ 20 được chấp nhận trong xét nghiệm NGS lâm sàng.

AF (gnomAD): tần suất alen của biến thể trong quần thể chung theo cơ sở dữ liệu Genome Aggregation Database (gnomAD). **ClinVar:** cơ sở dữ liệu quốc tế về mối liên quan giữa biến thể di truyền và bệnh lý

Kết quả từ **Bảng 5** cho thấy tất cả các biến thể đều đạt tiêu chí chất lượng theo AMP/CAP và được phân loại là benign theo tiêu chuẩn ACMG/AMP.

IV. BÀN LUẬN

Rối loạn oxy hóa acid béo (FAODs) là nhóm bệnh chuyển hóa bẩm sinh quan trọng do gián đoạn β -oxy hóa ty thể hoặc rối loạn vận chuyển acid béo qua “carnitine shuttle”, có thể gây hạ đường huyết không keton, suy gan, tăng ammoniac và tử vong nhanh ở giai đoạn sơ sinh nếu không được phát hiện sớm.⁵ Trong nhóm này, thiếu hụt carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A deficiency) là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, thường khởi phát trong các giai đoạn stress chuyển hóa (nhịn ăn, nhiễm trùng), và chẩn đoán xác định có vai trò quyết định trong điều trị và tư vấn di truyền.²

Nghiên cứu của chúng tôi đã thẩm định quy trình PCR-NGS nhắm đích gen CPT1A trên mẫu máu khô (DBS) với các chỉ số chất lượng vượt ngưỡng thực hành lâm sàng (theo AMP/CAP), phù hợp với xu hướng phát triển của công nghệ NGS trong ứng dụng y học chính xác và di truyền lâm sàng.⁹ Việc sử dụng bộ mồi amplicon bao phủ toàn bộ exon và vùng ranh giới exon-intron là điểm then chốt giúp đạt độ bao phủ sâu và đồng đều trên toàn gen; cách tiếp cận này cũng nhất quán với định

hướng của nhóm tác giả trong công bố gần đây về thiết kế và tối ưu hóa PCR phân tích CPT1A, tạo nền tảng vững chắc cho bước giải trình tự NGS nhắm đích.⁸ Với độ bao phủ 100% toàn bộ exon gen CPT1A ở mức $\geq 20\times$ và độ sâu trung bình $2.847\times$ (dao động $127,77\times$ đến $6.932,05\times$), quy trình này về mặt kỹ thuật có khả năng phát hiện hầu hết các biến thể SNV/InDel ở vùng mã hóa và ranh giới exon-intron, vốn chiếm đa số các biến thể gây bệnh đã được mô tả trong GeneReviews và ClinVar.^{2,6} Tuy nhiên, kỹ thuật amplicon-based có thể bỏ sót CNV hoặc biến thể cấu trúc lớn, đòi hỏi bổ sung các phương pháp khác nếu cần.⁷ Ở góc nhìn triển khai thực tế tại Việt Nam, đây là giá trị nổi bật vì DBS là loại mẫu chủ lực trong sàng lọc sơ sinh, đồng thời thường gặp thách thức về lượng DNA và chất ức chế PCR.

Về mặt sàng lọc, MS/MS có vai trò quan trọng trong phát hiện sớm FAODs nói chung và CPT1A deficiency nói riêng; chương trình sàng lọc sơ sinh đã góp phần thay đổi tần suất phát hiện và cải thiện kết cục lâm sàng ở nhiều rối loạn oxy hóa acid béo.¹ Tuy nhiên, kết quả của

chúng tôi cho thấy một tình huống lâm sàng “khó”: mẫu S01 có hồ sơ acylcarnitine điển hình nghi ngờ CPT1A deficiency (C0 tăng rất cao, C16/C18 giảm, tỷ số C0/(C16+C18) tăng mạnh), nhưng NGS không phát hiện biến thể gây bệnh trên CPT1A; các biến thể ghi nhận đều là biến thể lành tính theo ClinVar. Hiện tượng không tương đồng sinh hóa - di truyền (biochemical-genetic discordance) này có ý nghĩa thực hành, bởi MS/MS là xét nghiệm sàng lọc, có thể chịu ảnh hưởng của yếu tố sinh lý - bệnh lý quanh sinh và các điều kiện tiền phân tích, do đó vẫn cần xét nghiệm bậc hai/di truyền để khẳng định.^{1,5} Các nguyên nhân có thể bao gồm: biến đổi C0 do yếu tố tiền phân tích, chẩn đoán phân biệt với FAODs khác (như CPT2 hoặc CACT deficiency), hoặc biến thể quần thể đặc trưng (như ở Alaska Native).^{3,4}

Có một số nhóm nguyên nhân có thể giải thích việc “không tìm thấy driver mutation” (tức biến thể gây bệnh có ý nghĩa chẩn đoán) trong bối cảnh sinh hóa gợi ý mạnh. Thứ nhất, biến đổi C0 và tỷ số C0/(C16+C18) có thể dao động theo thời điểm lấy mẫu, tình trạng stress chuyển hóa sớm, dinh dưỡng và yếu tố tiền phân tích; các yếu tố này có thể góp phần tạo nên tín hiệu gợi ý bệnh trên MS/MS trong khi không có bệnh di truyền tương ứng.^{1,5} Thứ hai, chiến lược amplicon-based targeted NGS trong nghiên cứu tập trung chủ yếu vào SNV/InDel ở vùng được khuếch đại; do đó có thể bỏ sót các cơ chế di truyền khác như mất/nhân đoạn (CNV), tái sắp xếp cấu trúc, hoặc biến thể sâu trong intron/vùng điều hòa ảnh hưởng biểu hiện gen mà không nằm trong phạm vi amplicon.^{7,9} Thứ ba, cần cân nhắc khả năng chẩn đoán phân biệt: một số FAODs khác có thể tạo kiểu hình MS/MS chồng lấp, và ở các quần thể khác nhau, phổ biến thể/đột biến đặc trưng có thể khác biệt; mô tả lâm sàng-sinh hóa ở các cohort FAODs cũng cho thấy biểu hiện đa dạng và có thể khó phân loại nếu chỉ dựa trên một

lát cắt sinh hóa.^{3,5} Ngoài ra, các nghiên cứu ở quần thể Alaska Native cho thấy một số biến thể CPT1A “phổ biến theo quần thể” có thể liên quan đến dung nạp nhện ăn kém; điều này nhấn mạnh yếu tố quần thể và tính phức tạp của diễn giải mối liên quan genotype-phenotype trong CPT1A.⁴

Một điểm mạnh quan trọng của nghiên cứu là chất lượng dữ liệu giải trình tự cao và tiêu chí chất lượng tại vị trí biến thể được kiểm soát rõ ràng; đồng thời việc diễn giải biến thể theo ClinVar giúp chuẩn hóa thông tin và giảm sai khác giữa các phòng xét nghiệm. Các khuyến cáo chuyên ngành đều nhấn mạnh yêu cầu báo cáo rõ phương pháp, ngưỡng chất lượng và các giới hạn kỹ thuật của xét nghiệm NGS để tránh diễn giải quá mức, đặc biệt trong các tình huống “âm tính di truyền” nhưng sinh hóa gợi ý.^{6,7} Do vậy, kết quả “không tìm thấy driver mutation” trong nghiên cứu này cần được hiểu như một kết quả có giá trị loại trừ trong phạm vi kỹ thuật đã thẩm định, đồng thời là cơ sở để thiết kế chiến lược xác nhận tiếp theo (xét nghiệm bậc hai, mở rộng panel FAODs, hoặc bổ sung phân tích CNV/đột biến cấu trúc nếu điều kiện cho phép).

Hạn chế lớn nhất của nghiên cứu là cỡ mẫu rất nhỏ (chỉ 01 trường hợp đủ tiêu chuẩn trong thời gian nghiên cứu), do đó chưa thể suy rộng về phổ biến thể CPT1A trong quần thể Việt Nam hay ước tính tần suất các trường hợp discordance. Tuy nhiên, trong bối cảnh bệnh hiếm và mục tiêu trọng tâm là “thẩm định quy trình + ứng dụng thử nghiệm”, nghiên cứu mang lại ý nghĩa thực tiễn: chứng minh tính khả thi của mô hình PCR-NGS nhắm đích CPT1A trên DBS tại Việt Nam và cung cấp khung triển khai để giảm dương tính giả của sàng lọc MS/MS thông qua chẩn đoán di truyền xác nhận.^{1,5,8} Trong các bước tiếp theo, cần mở rộng số lượng mẫu, ưu tiên thu thập thêm thông tin lâm sàng và xây dựng quy trình xác nhận đa

phương pháp để làm rõ các trường hợp sinh hóa-di truyền không tương đồng.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định thành công quy trình PCR-NGS nhắm đích gen *CPT1A* trên mẫu máu khô, với các chỉ số chất lượng đạt và vượt các tiêu chuẩn thực hành quốc tế cho xét nghiệm di truyền lâm sàng. Quy trình cho độ bao phủ sâu, đồng đều trên toàn bộ gen *CPT1A*, chứng minh tính khả thi để triển khai tại Việt Nam.

Ở trường hợp bệnh nhi nghi ngờ duy nhất, mặc dù hồ sơ acylcarnitine trên MS/MS điển hình và gợi ý mạnh thiếu hụt *CPT1A*, phân tích NGS không phát hiện biến thể gây bệnh, chỉ ghi nhận các biến thể lành tính đã được mô tả trong cơ sở dữ liệu ClinVar. Kết quả này khẳng định vai trò quan trọng của NGS không chỉ trong phát hiện mà còn trong loại trừ chẩn đoán di truyền, góp phần làm rõ các trường hợp không tương đồng giữa sinh hóa và di truyền trong sàng lọc sơ sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Marsden D, Bedrosian CL, Vockley J. Impact of newborn screening on the reported incidence and clinical outcomes associated with medium- and long-chain fatty acid oxidation disorders. *Genet Med*. 2021; 23(5): 816-829. doi:10.1038/s41436-020-01070-0.

2. Lee K, Pritchard A, Ahmad A. Carnitine Palmitoyltransferase 1A Deficiency. 2005 Jul 27 [Updated 2025 Feb 20]. In: Adam MP, Bick S, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2025. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1527/>.

3. Baruteau J, Sachs P, Broué P, et al. Clinical and biological features at diagnosis in

mitochondrial fatty acid beta-oxidation defects: a French pediatric study of 187 patients. *J Inherit Metab Dis*. 2013; 36(5): 795-803. doi:10.1007/s10545-012-9542-6.

4. Gillingham MB, Hirschfeld M, Lowe S, et al. Impaired fasting tolerance among Alaska native children with a common carnitine palmitoyltransferase 1A sequence variant. *Mol Genet Metab*. 2011; 104(3): 261-264. doi:10.1016/j.ymgme.2011.06.017.

5. Merritt JL 2nd, Norris M, Kanungo S. Fatty acid oxidation disorders. *Ann Transl Med*. 2018; 6(24): 473. doi:10.21037/atm.2018.10.57.

6. Richards S, Aziz N, Bale S, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17(5): 405-424. doi:10.1038/gim.2015.30.

7. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017; 19(1): 4-23. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.10.002.

8. Tạ Văn Thọ, Trần Thị Chi Mai, Đặng Thị Thanh Mai, và cs. Thiết kế và tối ưu hóa phản ứng PCR phân tích gen *CPT1A* trong chẩn đoán thiếu hụt carnitine palmitoyltransferase 1A tại Việt Nam. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*. 2025; 197(12).

9. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016; 17(6): 333-351. doi:10.1038/nrg.2016.49.

Summary

VALIDATION OF A TARGETED NEXT-GENERATION SEQUENCING WORKFLOW FOR *CPT1A* GENE ANALYSIS USING DRIED BLOOD SPOTS FROM PEDIATRIC PATIENTS SUSPECTED OF CARNITINE PALMITOYL TRANSFERASE 1A DEFICIENCY IN VIETNAM

Carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) deficiency is a rare inherited disorder of fatty acid oxidation, biochemically characterized by elevated free carnitine (C0) and reduced long-chain acylcarnitines (C16, C18). This study aimed to establish a targeted next-generation sequencing (NGS) workflow for the CPT1A gene and to identify disease-causing variants in pediatric patients with suspected CPT1A deficiency detected by newborn screening. Twenty-one primer pairs covering all coding regions of CPT1A were designed and validated. PCR amplification was performed on dried blood spot samples and controls, followed by sequencing on the DNBSEQ-G200 platform. Sequencing quality metrics exceeded clinical standards, with Q30 \geq 84.5%, total reads of 14.65 million, duplication rate of 9.8%, mean depth ranging from 127.77 \times to 6,932.05 \times , and 100% target coverage at \geq 20 \times . In the suspected patient (S01), nine heterozygous variants were detected, all classified as benign according to ClinVar and gnomAD. Despite a strongly suggestive biochemical profile (C0 = 207.67 μ mol/L; C0/(C16+C18) \approx 407), no pathogenic variant was identified. These findings confirm the robustness of the PCR–NGS workflow and highlight the necessity of integrating biochemical screening, genomic analysis, and second-tier tests to resolve biochemical–genetic discordance in CPT1A deficiency.

Keywords: CPT1A deficiency, CPT1A gene, next-generation sequencing, NGS, fatty acid oxidation disorders, newborn screening.