

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) KHẢO SÁT NHÓM GEN GÂY BỆNH THẦN KINH DI TRUYỀN CHARCOT-MARIE-TOOTH

Nguyễn Nhật Quỳnh Như¹, Mai Phương Thảo², Đỗ Đức Minh¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Charcot-Marie-Tooth là nhóm bệnh lý thần kinh vận động-cảm giác di truyền do tổn thương bao myelin (CMT1) hoặc hủy sợi trục thần kinh (CMT2). Các triệu chứng lâm sàng của CMT bao gồm yếu và teo cơ ngón chi, mất cảm giác, phản xạ gân xương và bàn chân cong hình vòm (pes cavus). Hiện tại, hơn 80 gen được biết là có liên quan đến các loại CMT khác nhau. Bệnh có thể di truyền theo kiểu trội, lặn trên NST thường hoặc liên kết X.

Mục tiêu: Ứng dụng kỹ thuật Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) khảo sát gen gây bệnh Charcot-Marie-Tooth (CMT).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 30 bệnh nhân được chẩn đoán CMT dựa trên triệu chứng lâm sàng điển hình, DNA được tách chiết từ máu ngoại biên. Thực hiện phản ứng MLPA, điện di mao quản và phân tích kết quả bằng phần mềm Coffalyser.net xác định lặp/mất đoạn gen.

Kết quả: Trong số 30 bệnh nhân tham gia nghiên cứu, chúng tôi ghi nhận 5 trường hợp đột biến lặp đoạn gen PMP22 (chiếm 16,7%) và 25 mẫu còn lại không mang gen đột biến (chiếm 83,3%).

Kết luận: Nghiên cứu ứng dụng thành công kỹ thuật MLPA phát hiện các đột biến lặp đoạn gen gây bệnh CMT, giúp ích cho việc xét nghiệm gen chẩn đoán xác định bệnh lý thần kinh di truyền CMT.

Từ khóa: Charcot-Marie-Tooth, CMT1, CMT2, PMP22, GJB1, MLPA

ABSTRACT

APPLICATION OF MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) IN DETECTING DUPLICATION/DELETION OF CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE CAUSING GENES

Nguyen Nhat Quynh Nhu, Mai Phuong Thao, Do Duc Minh

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 25 - No 1 - 2021: 144-150

Background: Charcot-Marie-Tooth (CMT) is a group of inherited motor - sensory neuropathies, caused by the degradation of myelin sheath (CMT1) or axon (CMT2). Clinical symptoms of CMT include distal muscle weakness and atrophy, sensory loss, depressed tendon reflexes and high-arched feet (pes cavus). More than 80 genes are known to be associated with different types of CMT. The disease can be inherited in an autosomal dominant, autosomal recessive or X-linked manner.

Objectives: Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) has been used to detect deletion or duplication genes for diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease.

Methods: Blood samples were collected from 30 patients with clinical and EMG manifestations of inherited motor and sensory neuropathies. DNA was extracted from 2 mL of peripheral blood samples of patients. MLPA assay and electrophoresis were performed. Coffalyser.Net software was used for data analysis.

¹Trung tâm Y Sinh Học Phân Tử, Đại học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh

²Bộ môn Sinh lý-Sinh lý bệnh Miễn dịch, Khoa Y, Đại học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: TS. Đỗ Đức Minh ĐT: 0932.999989 Email: ducminh@ump.edu.vn

Results: The CMT duplication was detected in 5 patients with duplication of PMP22 gene (16,7%) and the remaining 25 patients (66,7%) have no deletion/duplication detected on evaluated panel genes.

Conclusion: MLPA was successfully applied in identification of duplication or deletion mutants in CMT genes, helping to test for diagnostic genes to determine CMT genetic neuropathy.

Keywords: Charcot-Marie-Tooth, CMT1, CMT2, PMP22, GJB1, MLPA

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Charcot-Marie-Tooth (CMT) là một trong những rối loạn thần kinh di truyền phổ biến nhất, biểu hiện với kiểu hình của một bệnh lý thần kinh tiến triển mạn tính ảnh hưởng đến cả dây thần kinh vận động và cảm giác⁽¹⁾. Tần suất mắc bệnh thay đổi tùy từng quốc gia, chủng tộc, ước tính khoảng 1/2500⁽¹⁾– 1/9200⁽²⁾.

CMT được đặc trưng bởi sự yếu cơ, thường xuất hiện ở các cơ ngón chi, chân trước sau đó đến tay, có thể kèm theo mất cảm giác. Bệnh tiến triển lâu ngày gây biến dạng chi, giảm phản xạ gân xương⁽³⁾. Dựa trên khảo sát vận tốc dẫn truyền thần kinh vận động (NCV), có thể chia CMT thành hai dạng chính: hủy myelin (CMT1) có NCV <38 m/giây và tổn thương sợi trục (CMT2) với NCV bình thường hoặc có thể chậm và giảm điện thế hoạt động cơ kết hợp⁽³⁾. Cả hai dạng hủy bao myelin và tổn thương sợi trục đều có thể được di truyền theo kiểu trội, lặn trên NST thường hoặc liên kết X.

Dựa trên các đánh giá về triệu chứng lâm sàng và đặc điểm di truyền khi phân tích phả hệ, CMT còn được chia thành các type chính:

- CMT1 gây tổn thương mất myelin, di truyền trội nhiễm sắc thể thường, gây kiểu hình CMT cổ điển với đặc điểm yếu/teo cơ ngón chi, mất cảm giác và bàn chân hình vòm. Đa số bệnh nhân giảm hoặc không có phản xạ ở cả tay và chân⁽⁴⁾. Tuổi phát bệnh là từ 5 đến 25 năm đầu của cuộc sống. CMT1 chiếm khoảng 50% trong tổng số bệnh nhân mắc CMT và hầu hết các trường hợp có thể được xác định bằng xét nghiệm di truyền phân tử. CMT1 được chia thành 6 phân nhóm phụ, trong đó CMT1A do lặp đoạn gene là nguyên nhân phổ biến nhất chiếm khoảng 70% các trường hợp CMT1⁽²⁾. Ngoài ra có thể gặp như run tay, giảm thính lực,

vẹo cột sống, phì đại bắp chân, đau, yếu cơ hoành, giảm âm và thậm chí liên quan đến não với suy giảm nhận thức⁽⁵⁾.

- CMT2 là dạng tổn thương sợi trục thần kinh, chiếm khoảng 20% các trường hợp CMT⁽⁶⁾. CMT2A do đột biến gen *MFN2* là phổ biến nhất và có thể chiếm 10-30% các trường hợp CMT2 ở nhiều chủng tộc khác nhau^(7,8). Bệnh di truyền trội nhiễm sắc thể thường. Tuy nhiên, một số người gặp phải kiểu hình rất nghiêm trọng đôi khi bao gồm teo mắt và thường bị khởi phát sớm (<10 tuổi)⁽⁹⁾. Một số trường hợp người mang đột biến bị ảnh hưởng nhẹ hoặc không có triệu chứng cũng được quan sát thấy ở một số gia đình⁽⁷⁾. CMT2B do những thay đổi trong gen *RAB7A* gây ra, với tuổi khởi phát vào năm 20 tuổi đến 30 tuổi⁽¹⁰⁾.

- CMT4 là nhóm bệnh CMT di truyền lặn nhiễm sắc thể thường, liên quan tổn thương myelin và sợi trục thần kinh. Có 9 gen (*GDAP1*, *MTMR2*, *SBF2*, *SH3TC2*, *NDRG1*, *EGR2*, *PRX*, *FGD4*, *FIG4*) đã được xác định liên quan đến CMT4. Kiểu hình ở nhóm bệnh này biểu hiện nặng, khởi phát sớm, xuất hiện yếu liệt và teo các cơ ngón chi sau đó lan dần đến các cơ gốc chi. Các triệu chứng khác bao gồm: giảm phản xạ gân cơ, vẹo cột sống và biến dạng bàn chân hình vòm. Người bệnh có thể mất khả năng đi lại⁽⁸⁾.

- CMTX là dạng di truyền phổ biến thứ hai sau CMT1A và có kiểu di truyền trội liên kết X. Gen *GJB1* là nguyên nhân chính của CMTX1 và chịu trách nhiệm cho hầu hết các trường hợp CMTX, chiếm khoảng 10% trong tổng số trường hợp CMT⁽¹¹⁾. Nam giới trung bình bị ảnh hưởng nghiêm trọng hơn so với nữ giới thường biểu hiện mức độ NCV chậm hoặc trung bình. Nữ giới có thể khỏe mạnh hoặc bị ảnh hưởng nhẹ. Nam giới ở lứa tuổi thanh niên xuất hiện các

triệu chứng điển hình như CMT1 gồm yếu liệt và teo cơ ngón chi, bàn chân hình vòm, ngón chân hình búa và ngón tay hình móng vuốt. Đến lứa tuổi 50 - 60, người bệnh bị rối loạn tư thế, phải ngồi xe lăn.

Hơn 80 gen được xác định là có liên quan đến các loại CMT khác nhau⁽¹²⁾. Mặc dù CMT cơ bản không đồng nhất về gen và cơ chế sinh lý bệnh, gần 90% các trường hợp được xác nhận về mặt di truyền trên các nhóm thuần tập khác nhau là do đột biến ở 4 gen mất/lặp đoạn gen *PMP22* và đột biến ở các gen *PMP22* (*CMT1A*), *GJB1* (*CMTX1*), *MFN2* (*CMT2A*) và *MPZ* (*CMT1B*)⁽¹²⁾. Đột biến lặp đoạn *PMP22* là đột biến phổ biến nhất, chiếm khoảng 70% các trường hợp CMT1⁽²⁾. 10-12% các trường hợp CMT1 là do đột biến gen *MPZ* và *MPZ* cũng xuất hiện ở các thể CMT khác. Trong khi đó nguyên nhân phổ biến của CMT2 là đột biến trên gen *MFN2*, chiếm 20% số trường hợp. *CMTX* chiếm khoảng 10-15% các trường hợp CMT trong đó, 90% số trường hợp của *CMTX* là do đột biến gen *GJB1*. Bên cạnh lặp đoạn *PMP22* – là dạng đột biến thường gặp nhất gây ra type 1A (*CMT1A*), đột biến mất đoạn hoặc lặp đoạn các gen *MFN2*, *MPZ*, *GJB1* đã được ghi nhận trong một số nghiên cứu trên thế giới. Mất đoạn gen *MFN2* (exon 13 – exon 17) được tìm thấy trong nghiên cứu của Østern R (2013) khi khảo sát 229 bệnh nhân bằng kỹ thuật MLPA⁽¹³⁾. Một nghiên cứu của Aisling S Carr. (2015) cũng phát hiện mất đoạn gen *MFN2* (exon 6 và exon 7) ở 4 gia đình⁽¹⁴⁾. Lặp đoạn gen *MPZ* được phát hiện ở 7 bệnh nhân trong một đại gia đình ở Na Uy do nhóm nghiên cứu của Høyer H (2011) thực hiện⁽¹⁵⁾. Trong khi đó, nghiên cứu của He J (2018) đã phát hiện 3 trường hợp mất đoạn exon 6 trên gen *MPZ* trong 44 trường hợp được khảo sát⁽¹⁶⁾. Một trường hợp mất đoạn dạng dị hợp gen *GJB1* đã được phát hiện bởi Kulshrestha R (2017)⁽¹⁷⁾.

Kỹ thuật MLPA (Multiplex Ligation – Dependent Probe Amplification) ra đời và được áp dụng rộng rãi trong chẩn đoán các bệnh rối loạn di truyền do thay đổi lượng gen, đặc biệt là

các đột biến mất/lặp đoạn gen. Kỹ thuật MLPA có ưu điểm là dễ thực hiện, cho kết quả nhanh và có độ chính xác cao^(18,19). Vì vậy chúng tôi thực hiện đề tài này với mục tiêu: Ứng dụng kỹ thuật MLPA khảo sát lặp đoạn và mất đoạn nhóm gen gây bệnh Charcot-Marie-Tooth.

ĐỐI TƯỢNG-PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

30 bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh CMT dựa trên các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng điển hình tại phòng khám Thần kinh, bệnh viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.

Dựa trên phân tích đặc điểm lâm sàng và do điện cơ ký, 30 bệnh nhân sau đó được phân loại thành các phân nhóm phụ của CMT gồm 13 trường hợp CMT1, 9 trường hợp *CMTX*, 7 trường hợp CMT2 và 1 trường hợp CMT4.

Phương pháp nghiên cứu

Quy trình lấy mẫu và tách chiết DNA

Bệnh nhân được lấy 2 ml máu ngoại biên chứa trong ống EDTA Vacutanier (Becton Dickinson) và giữ mát 4°C không quá 24h trước khi tiến hành tách chiết DNA. Mẫu sau khi thu nhận được đưa về phòng thí nghiệm và tiến hành ly trích DNA bằng bộ kit Qiagen Dnaeasy Blood Kit.

Đo nồng độ và độ tinh sạch DNA

Sản phẩm được kiểm tra bằng máy Nano-drop để đánh giá độ tinh sạch và xác định nồng độ DNA. Các mẫu DNA có nồng độ từ 50 đến 250 ng/μl và đạt tiêu chuẩn về độ tinh sạch ở bước sóng 260/280 >1,8 trở lên mới được sử dụng để chạy phản ứng MLPA.

Tiến hành phản ứng MLPA

Sử dụng kit SALSA MLPA Probemix P033 (*CMT1A*), P405 (*CMTX*), P406 (*CMT2B*), P143 (*CMT2A*), và P353 (*CMT4*) (Marc-Holland) chứa các probe lai đặc hiệu với các vùng gen gây bệnh CMT.

Quy trình phản ứng MLPA như sau:

Phản ứng lai: 50 ng genomic DNA (hòa trong 2,5 μl) được biến tính và lai với 1,5 μl hỗn

hợp probe cùng với 1,5 µl buffer MLPA. Sau đó lại ở 60°C trong vòng 18 giờ (qua đêm).

Phản ứng nối: Cho enzyme ligase vào và ủ ở 54°C trong 15 phút. Sau đó tăng nhiệt độ lên 98°C trong 5 phút để phá hủy enzyme ligase và tiến hành thực hiện quy trình nhiệt của phản ứng PCR để khuếch đại các probe.

Phản ứng PCR: Tăng nhiệt độ lên 60°C trước khi đi vào chu trình nhiệt. Thành phần phản ứng PCR gồm primer, polymerase, buffer, dNTP, nước. Chu kỳ nhiệt: 90°C trong 20 giây, 65°C trong 30 giây, 72°C trong 60 giây, lặp lại 35 chu kỳ. Sau đó kéo dài kết thúc ở 72°C trong 20 phút.

Cuối cùng, nhiệt độ được hạ xuống còn 4°C. Điện di mao quản và phân tích kết quả: Sản phẩm sau khuếch đại được phân tách đoạn trên hệ thống điện di mao quản Applied Biosystems ABI 3500.

Kết quả sau khi điện di được phân tích nhằm xác định đột biến mất/lặp đoạn gen bằng công cụ coffalyser.net (Marc-Holland). Mỗi tín hiệu (chấm vàng – Hình 1A) là sản phẩm của một probe. Kích thước của mỗi tín hiệu được xác định nhờ so sánh với thang kích thước của mẫu đối chứng để tính ra tỉ lệ DQ (Dosage quotients). Trường hợp bệnh nhân không bị đột biến mất/lặp đoạn gen thì tỷ lệ DQ xấp xỉ bằng 1. Bệnh nhân bị đột biến mất đoạn dạng dị hợp tử khi DQ nằm trong khoảng giữa 0,4 và 0,65, nếu giá trị DQ nằm trong khoảng 1,35 và 1,65 thì bệnh nhân bị đột biến lặp đoạn dị hợp tử và từ 1,75 trở lên thì bệnh nhân bị đột biến lặp đoạn dạng đồng hợp tử. Kết quả phân tích còn được quan sát qua biểu đồ chiều cao các probe để so sánh với mẫu đối chứng, trường hợp mất đoạn xảy ra khi chiều cao các probe ở mẫu bệnh bằng ½ chiều cao probe ở mẫu đối chứng và lặp đoạn khi chiều cao các probe tăng so với mẫu đối chứng.

Y đúc

Nghiên cứu này được thông qua bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Đại học Y Dược TP. HCM, số 551/ĐHYD-HĐĐĐ,

ngày 25/10/2019.

KẾT QUẢ

Dựa trên phân tích đặc điểm lâm sàng và kết quả điện cơ ký mà bệnh nhân được phân loại thuộc các phân nhóm phụ của CMT, từ đó chúng tôi tiến hành lựa chọn các probemix phù hợp để khảo sát.

Kết quả khảo sát nhóm bệnh CMT1

Trong 13 trường hợp được chẩn đoán phân loại nhóm CMT1 và khảo sát đột biến gen *PMP22*, chúng tôi ghi nhận 5 trường hợp đột biến lặp đoạn gen *PMP22*. Ở người bình thường khi được khảo sát 16 probe ở vùng 17p12 chứa gen *PMP22* ghi nhận tỉ lệ DQ xấp xỉ bằng 1, trong khi đó ở bệnh nhân xuất hiện các tín hiệu probe ở vùng gen này vượt lên ở khoảng 1,5, chứng tỏ có sự lặp đoạn dạng dị hợp tử gen *PMP22* (Hình 1A, B). Hình ảnh đỉnh sóng cũng cho thấy sự khác biệt khi so sánh giữa mẫu chứng và mẫu bệnh nhân, vị trí các đỉnh sóng tương ứng với vị trí các exon gen *PMP22* cao hơn ở bệnh nhân so với mẫu bình thường, ghi nhận có lặp đoạn gen *PMP22* (Hình 1C, D).

Kết quả khảo sát nhóm bệnh CMTX

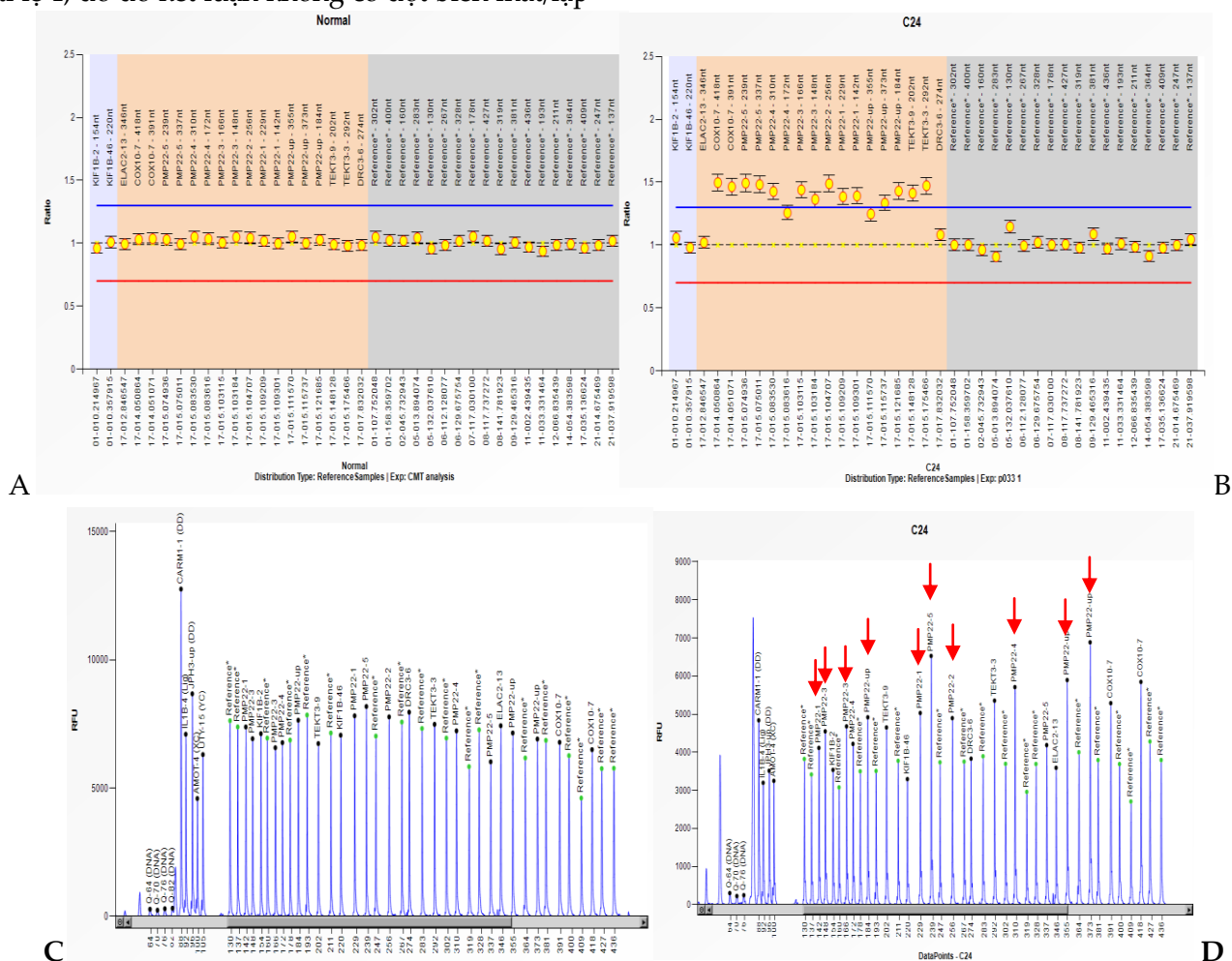
Thực hiện khảo sát 17 trường hợp trong đó gồm 9 trường hợp được chẩn đoán phân loại nhóm CMTX và 8 bệnh nhân không phát hiện lặp đoạn gen *PMP22* trước đó, chúng tôi không ghi nhận bất thường trên gen *GJB1*. Trường hợp ở bệnh nhân C31, hình ảnh phân tích cho thấy vị trí các probe đặc hiệu cho các exon ở nhóm gen khảo sát đều nằm trong ngưỡng bình thường (Hình 2A), và chiều cao các đỉnh tương ứng với các gen đều không ghi nhận bất thường so với mẫu đối chứng (Hình 2B).

Kết quả khảo sát nhóm bệnh CMT2

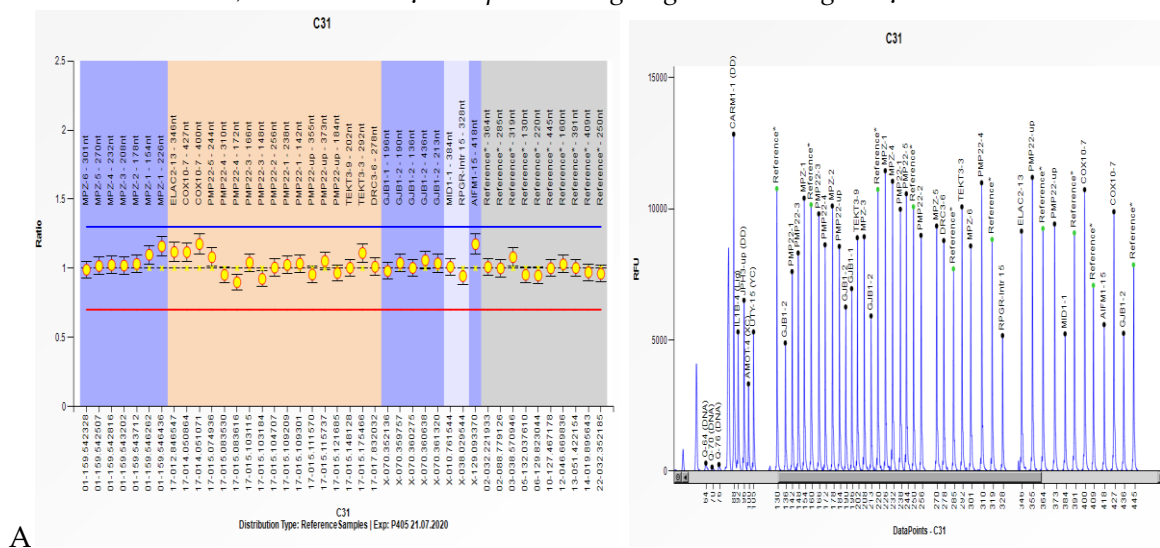
Đột biến gen *MFN2* là nguyên nhân phổ biến gây bệnh CMT2A, chiếm 20% các trường hợp. Chúng tôi tiến hành khảo sát gen *MFN2* ở 7 bệnh nhân được chẩn đoán CMT2 dựa trên các đặc điểm lâm sàng và không ghi nhận mất hoặc lặp đoạn gen ở 7 trường hợp này. Kết quả phân tích MLPA cho thấy các probe đặc hiệu tại 19

exon trên gen *MFN2* có giá trị nằm trong khoảng tỉ lệ 1, do đó kết luận không có đột biến mất/lấp

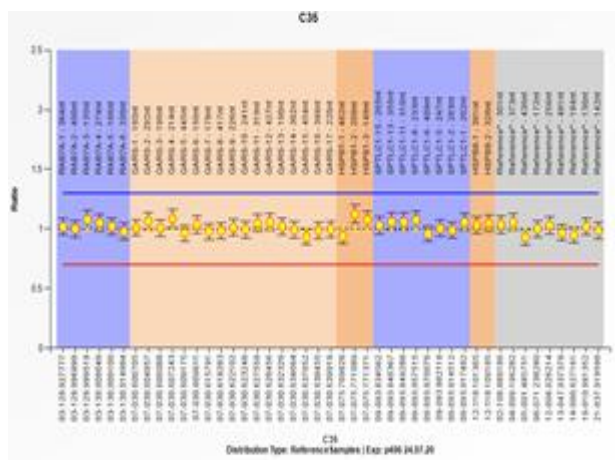
đoạn gen *MFN2* (Hình 3).



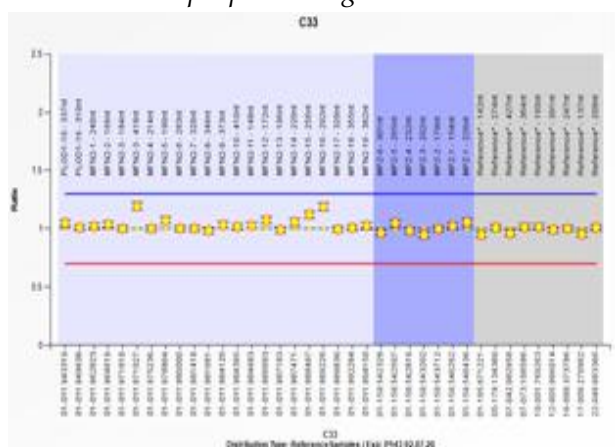
Hình 1: Kết quả phân tích gen *PMP22*. Chấm tròn màu vàng: tỉ lệ DQ, A: Người bình thường, B: Bệnh nhân C24. C, D: Biểu đồ tỉ lệ đỉnh probe tương ứng ở mẫu chứng và bệnh nhân C24



Hình 2: Kết quả phân tích gen *GJB1*. A: Biểu đồ tín hiệu probe. B: Biểu đồ tỉ lệ chiều cao đỉnh probe

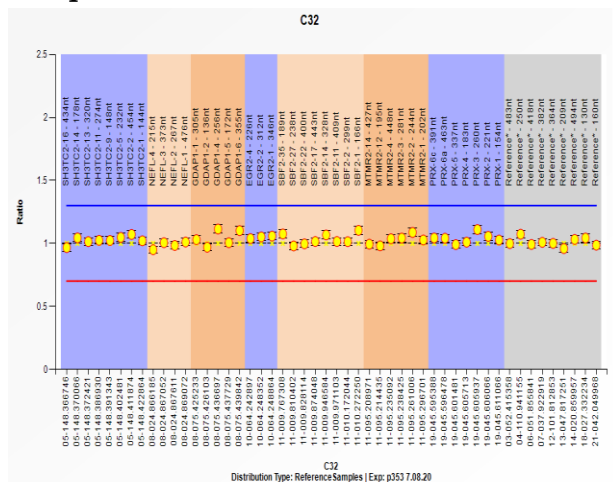


Hình 3: Kết quả phân tích gen MFN2 ở BN C33



Hình 4: Kết quả phân tích gen RAB7A, GARS, HSPB1, HSBP8, SPTLC1 ở bệnh nhân C35

Kết quả khảo sát nhóm bệnh CMT4



Hình 5: Kết quả phân tích gen GDAP1, MTMR2, SBF2, SH3TC2, EGR2, PRX ở bệnh nhân C32

Sau khi đã sàng lọc các phân nhóm CMT phổ biến (CMT1, CMTX, CMT2) và không ghi nhận đột biến ở 15/30 trường hợp, việc khảo sát

các gen gây bệnh ở phân nhóm CMT4 được thực hiện trên 15 bệnh nhân và 1 trường hợp được chẩn đoán ở nhóm bệnh CMT4. Cụ thể có 6 gen bao gồm *GDAP1*, *MTMR2*, *SBF2*, *SH3TC2*, *EGR2*, *PRX* được khảo sát trên 16 bệnh nhân. Kết quả phân tích MLPA không ghi nhận đột biến mất hoặc lặp đoạn trên vùng gen này ở 16 trường hợp trên (Hình 5).

BÀN LUẬN

CMT là bệnh lý thần kinh di truyền đa gen. Mặc dù không gây tử vong nhưng những tổn thương trên vận động, cảm giác kèm biến dạng chi gây nhiều khó khăn cho người bệnh trong các sinh hoạt thường ngày. Việc khảo sát gen để xác định nguyên nhân gây bệnh đóng vai trò quan trọng trong phân loại nhóm bệnh, từ đó hỗ trợ trong chẩn đoán và điều trị.

Có nhiều kỹ thuật chẩn đoán CMT trong đó phương pháp MLPA có giá trị trong xác định các đột biến lặp đoạn hoặc mất đoạn mà kỹ thuật giải trình tự có thể bỏ sót. Kỹ thuật MLPA có khả năng khảo sát nhiều vị trí exon và nhiều gen cùng lúc từ đó giảm bớt chi phí, thời gian khi thực hiện xét nghiệm. Bằng kỹ thuật MLPA khảo sát các đột biến mất/lặp đoạn gen gây bệnh CMT trên 30 bệnh nhân, chúng tôi ghi nhận 5 trường hợp đột biến lặp đoạn gen *PMP22* (chiếm 38,5% trong 13 trường hợp CMT1) và 25 trường hợp không phát hiện bất thường mất/lặp đoạn gen trên các vùng gen đã khảo sát.

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát hiện 5/30 trường hợp lặp đoạn *PMP22*, ngoài ra không phát hiện đột biến mất hoặc lặp đoạn các gen khác được khảo sát. Điều này được giải thích do kỹ thuật MLPA chỉ phát hiện đột biến mất/lặp đoạn gen mà không thể phát hiện đột biến điểm, trong khi đó ngoài lặp đoạn gen *PMP22*, phần lớn đột biến gây bệnh CMT được ghi nhận trong các nghiên cứu và tài liệu y văn trên thế giới là các đột biến điểm. Do đó việc áp dụng thêm các phương pháp như giải trình tự Sanger, giải trình tự gen thế hệ mới để khảo sát, phát hiện đột biến là cần thiết giúp chẩn đoán phân loại nhóm bệnh CMT.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã bước đầu ứng dụng thành công kỹ thuật MLPA để phát hiện các đột biến lặp đoạn gen gây bệnh Charcot-Marie-Tooth. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc chẩn đoán phân loại nhóm bệnh. Bên cạnh đó, với kết quả chẩn đoán gen giúp thuận lợi trong việc tư vấn cho gia đình, người thân, khu trú gen khảo sát, tầm soát người mang gen bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andersson PB, Yuen E, Parko K, So YT (2000). Electrodiagnostic features of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neurology*, 54(1):40-40.
- Morena J, Gupta A, Hoyle JC (2019). Charcot-Marie-Tooth: From Molecules to Therapy. *Int J Mol Sci*, 20(14):3419.
- Pareyson D, Marchesi C (2009). Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol*, 8(7):654-667.
- Je H, M DV, Pa B, Aa H, Bw O de V (1994). Hereditary motor and sensory neuropathy type I: clinical and neurographical features of the 17p duplication subtype. *Muscle & Nerve*, 17:85-90.
- Marques W, Freitas MR, Nascimento OJM, et al (2005). 17p duplicated Charcot-Marie-Tooth 1A: characteristics of a new population. *J Neurol*, 252(8):972-979.
- Harding AE, Thomas PK (1980). The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain J Neurol*, 103(2):259-280.
- Lawson VH, Graham BV, Flanigan KM (2005). Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology*, 65(2):197-204.
- Züchner S, De Jonghe P, Jordanova A, et al (2006). Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol*, 59(2):276-281.
- Chung KW, Suh BC, Cho SY, et al (2010). Early-onset Charcot-Marie-Tooth patients with mitofusin 2 mutations and brain involvement. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81(11):1203-1206.
- Braathén GJ. (2012). Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol Scand Suppl*, (193):iv-22.
- Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, et al (2002). Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol*, 51(2):190-201.
- Murphy SM, Laura M, Fawcett K, et al (2012). Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(7):706-710.
- Østern R, Fagerheim T, Hjeltnes H, Nygård B, Mellgren SI, Nilssen Ø (2013). Diagnostic laboratory testing for Charcot Marie Tooth disease (CMT): the spectrum of gene defects in Norwegian patients with CMT and its implications for future genetic test strategies. *BMC Med Genet*, 14:94.
- CARR AS, et al (2015). MFN2 deletion of exons 7 and 8: founder mutation in the UK population. *J Peripher Nerv Syst*, 20(2) 67-71.
- Høyer H, Braathén GJ, Eek AK, Skjelbred CF, Russell MB (2011). Charcot-Marie-Tooth caused by a copy number variation in myelin protein zero. *Eur J Med Genet*, 54(6):e580-583.
- He J, Guo L, Xu G, et al (2018). Clinical and genetic investigation in Chinese patients with demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*, 23(4):216-226.
- Kulshrestha R, Burton-Jones S, Antoniadis T, et al (2017). Deletion of P2 promoter of GJB1 gene a cause of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord NMD*, 27(8):766-770.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijsburg D, Diepvens F, Pals G (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30(12): e57.
- Slater H, Bruno D, Ren H, et al (2004). Improved testing for CMT1A and HNPP using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) with rapid DNA preparations: comparison with the interphase FISH method. *Hum Mutat*, 24(2):164-171.

Ngày nhận bài báo:	30/11/2020
Ngày nhận phản biện nhận xét bài báo:	20/02/2020
Ngày bài báo được đăng:	10/03/2021