

CHẨN ĐOÁN NHIỄM VIRUS RUBELLA Ở THAI NHI BẰNG KỸ THUẬT RT-PCR

Hoàng Thị Hương, Hoàng Thị Ngọc Lan, Lê Anh Tuấn

Tóm tắt

Nghiên cứu này ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán trước sinh với **Mục tiêu:** phát hiện sớm nhiễm Rubella ở thai nhi. Trên 74 đối tượng thai phụ nghi ngờ bị nhiễm virus Rubella dựa vào các chỉ số sinh hóa miễn dịch (IgG & IgM) và các biểu hiện lâm sàng. **Phương pháp nghiên cứu:** Sử dụng phương pháp sinh học phân tử RT-PCR để phát hiện genome của virus Rubella trong mẫu dịch ối được thu thập ở tuần thứ 6-7 sau khi thai phụ có biểu hiện sốt phát ban. **Kết quả:** Trong số 74 ca nghiên cứu, tỷ lệ phát hiện genome của virus trong mẫu dịch ối chiếm 70 - 75% khi các thai phụ bị nhiễm ở quý I của thai kỳ. Và tỷ lệ nhiễm này giảm xuống khi thời kỳ nhiễm diễn ra vào quý II của thai kỳ (25%). Đối với các trường hợp có biểu hiện nhiễm và tiêm vaccin vào khoảng thời gian từ 1-4 tuần trước và sau kinh cuối cùng thì tỷ lệ nhiễm giảm đi rõ rệt (4% và 0%, tương ứng). Theo dõi sau sinh đối với các đối tượng thai phụ trong nghiên cứu, chúng tôi không phát hiện thấy trường hợp mang hội chứng Rubella bẩm sinh nào trong số 52 trường hợp âm tính với virus Rubella, 1 trường hợp dương tính với virus Rubella mang hội chứng Rubella bẩm sinh. Các trường hợp dương tính còn lại đã đình chỉ thai và tiến hành làm xét nghiệm IgM của thai nhi sau khi đình chỉ thai nghén. **Kết luận:** Các kết quả của chúng tôi đã cho thấy RT-PCR là một kỹ thuật có độ chính xác cao trong chẩn đoán nhiễm virus Rubella ở thai nhi của những thai phụ có biểu hiện nhiễm và nghi ngờ bị nhiễm. **Từ khóa:** Rubella, thai nghén, chẩn đoán trước sinh, RT-PCR

Abstract

Diagnosis of fetal rubella virus infection by realtime-pcr

This research apply new method for early diagnosis of the Rubella infection in fetuses using biotechnological technique in prenatal diagnosis. **Objectives:** to carried out 74 cases of suspected infection in pregnancies. **Materials and Methodology:** by using the Realtime-PCR (RT-PCR) to detect Rubella virus RNA in amniotic fluid collected at the 6-7th week after onset of rash symptom based on specific primers which targeted a variable region of the E1 gene. **Results:** In this limited report, based on IgG and IgM results and clinical symptoms such as fever, rash and some others. In 74 cases, we found that Rubella virus genome was detected in 70 - 75% maternal infection with virus occurred during the first trimester of pregnancy, and decreased when the infection took place during the second trimester (25%),

about 1-4 weeks before & after final menstruation (4%), and vaccination from 1 to 4 weeks before final menstrual cycle (0%). And there is no CRS (congenital Rubella syndrome) case in the group of 52 cases negative to Rubella virus. In the group positive to Rubella virus, one livebirth had CRS and the others were terminated with IgM test following. **Conclusion:** Our results suggested that RT-PCR is very useful for assisting with prenatal diagnosis in pregnancies who have suspected infection.

Key words: Rubella, pregnancy, diagnosis, RT-PCR.

Trung tâm chẩn đoán trước sinh, Bệnh viện Phụ sản Trung ương

Đặt vấn đề

Hiện nay, hiếm gặp trường hợp nhiễm virus Rubella tại các đất nước phát triển do họ đã có nhiều chương trình tiêm chủng phòng, ngừa. Tuy nhiên, ở những nước đang phát triển nhiễm Rubella vẫn còn là nguyên nhân chủ yếu dẫn đến các dị tật bẩm sinh đang diễn ra ở trẻ nhỏ như: bệnh mù, điếc và bệnh tim bẩm sinh [1]. Rubella được biết đến như một loại bệnh sởi Đức, lần đầu tiên được 2 bác sỹ của đất nước này phát hiện vào khoảng giữa thế kỷ 18 [2,3]. Khởi đầu, bệnh do loài virus Rubella gây ra được cho là lành tính và thường xảy ra ở trẻ nhỏ. Tuy nhiên, vào năm 1941 một nhà khoa học người Úc, Norman McAlister Gregg, đã phát hiện ra nhóm trẻ sơ sinh mắc bệnh đục thủy tinh thể bẩm sinh [4]. Một số trẻ đồng thời cũng mang chứng bệnh tim bẩm sinh. Và điều ngạc nhiên là hầu hết các bà mẹ của nhóm trẻ sơ sinh trên đều có tiền sử nhiễm Rubella ở giai đoạn đầu của thời kỳ mang thai có biểu hiện sốt phát ban trong một thời gian ngắn khi diễn ra đại dịch ở xứ New South Wales. Sau đó, những quan sát thiết thực này của Gregg đã được nhiều nhà khoa học khác khẳng định lại [5]. Nhờ vậy mà thế giới đã hiểu được thế nào là virus Rubella, cách phân lập virus và sự ra đời của vaccine phòng ngừa cùng với lời cảnh báo của Tổ chức Y tế thế giới WHO về việc ngăn chặn hội chứng Rubella bẩm sinh [4-6-7].

Con người là vật chủ duy nhất của loài virus Rubella. Thời gian ủ bệnh của chúng tới lúc có biểu hiện sốt phát ban kéo dài khoảng 14 - 21 ngày rồi kết thúc vào 1 - 5 ngày sau đó. Khi bị nhiễm chúng thường gây cho con người có cảm giác mệt mỏi, đau đầu, đau khớp, và tiếp đến là các nốt mẩn đỏ xuất hiện từ đầu, mặt, cổ, chân, tay... một số trường hợp bệnh nhân có biểu hiện sốt và nổi hạch [8].

Ở phụ nữ mang thai, sau khi có biểu hiện sốt phát ban virus sẽ tấn công vào bánh rau rồi lan truyền đến thai nhi trong vòng 6 - 7 tuần, chúng tiếp tục phát triển và lan rộng, tác động đến một số cơ quan như tai, mắt và tim... từ đó có thể gây ra các dị tật bẩm sinh nặng nề cho thai nhi. Tuy nhiên, tùy theo thời điểm nhiễm khác nhau của thai nhi mà dẫn đến tỷ lệ trẻ sinh ra bị nhiễm khác nhau [9].

Do vậy sự ra đời của kỹ thuật sinh học phân tử (RT-PCR) là vô cùng quan trọng, đóng góp một phần không thể thiếu trong việc chẩn đoán sớm thai nhi bị nhiễm virus Rubella đối với những trường hợp thai phụ có biểu hiện nhiễm và nghi ngờ bị nhiễm dựa vào việc phát hiện ra hệ gen của virus trong các mẫu bệnh phẩm từ thai nhi.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu: Sau khi làm hồ sơ bệnh án, hội chẩn, tiến hành chọc ối thu thập mẫu vào các ống eppendorf sạch và đã qua khử

trùng. Ly tâm tốc độ cao trong vòng 15 phút. 150ul dịch cận ôi sẽ được dùng để tách chiết RNA. Các mẫu bệnh phẩm có thể được bảo quản ở -75°C khi chưa tiến hành quá trình tách chiết RNA.

Tách chiết RNA: Dựa theo kit tách chiết RNA-Trizol[®] reagent của Invitrogen (Code: 15596-018), RNA của virus được tách chiết theo quy trình sau: **phá vỡ tế bào** mix 150ul dịch cận ôi với 450ul dung dịch tách, ủ ở nhiệt độ phòng 5-10 phút để phân hủy tế bào, giải phóng RNA; **chiết RNA** hỗn hợp phân hủy trên được chiết với 120ul Chloroform tại ở nhiệt độ phòng trong vòng 15 phút, sau đó tiến hành ly tâm 15 phút với tốc độ 13000 vòng/phút để tách RNA ra khỏi lớp phức hợp protein & lipid; **tủa RNA** lượng RNA tổng số thu được trong lớp dịch nổi trên cùng (~300ul) sẽ được tủa trong 300ul Isopropanol 10 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 13000 vòng/phút thu cận RNA tổng số; **rửa tủa RNA** cận RNA tổng số được rửa trong 700ul cồn 75%, tiếp tục ly tâm thu cận rồi hòa tan cận trong 10-15ul nước loại RNase, ủ ở 56°C trong vòng 10 phút. 2 - 2,5ul RNA tổng số sẽ được dùng cho phản ứng tổng hợp cDNA và RT-PCR hoặc bảo quản mẫu ở -75°C.

Tổng hợp cDNA và khuếch đại gen: Theo Rubella Realtime PCR Kit (Code: FR108) của hãng Genekam Biotechnology AG - Đức, mix hỗn hợp các thành phần phản ứng với 2-2,5ul RNA tổng số sau tách chiết trong các ống chạy realtime PCR, ly tâm với tốc độ 8000 vòng/phút trong 20 giây. Thiết lập chu trình nhiệt cho quá trình tổng hợp cDNA (60 phút – 42°C, 10 phút – 70°C), và quá trình khuếch đại gen (15 giây – 95°C, 60 giây – 60°C, lặp lại 45 chu kỳ) trên máy Real-Time PCR của Biorad. Tiến hành đặt, chạy mẫu và phân tích kết quả. Ở đây, mẫu chứng dương (huyết thanh người có mang chủng virus

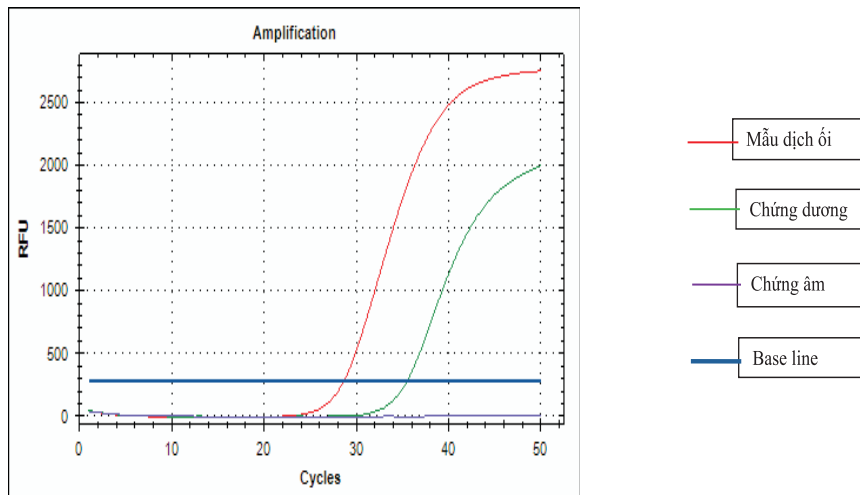
quốc tế) và mẫu chứng âm (huyết thanh người không mang virus Rubella) được chạy song song làm đối chứng.

Kết quả và bàn luận

Ứng dụng kỹ thuật RT-PCR cho phát hiện hệ gen virus Rubella trong dịch ối.

Mặc dù Rubella là loài virus gây bệnh chủ yếu ở trẻ nhỏ, tuy nhiên theo thống kê có tới trên 70% trường hợp diễn ra ở những người có độ tuổi trên 15 và ở độ tuổi sinh sản. Bệnh diễn tiến theo mùa 4 - 6 năm, vào cuối mùa đông và đầu mùa xuân.

Đối với phụ nữ mang thai, do khả năng miễn dịch kém nên tỷ lệ nhiễm Rubella tương đối cao. Bên cạnh đó, việc chẩn đoán nhiễm về mặt lâm sàng trên những đối tượng này còn gặp nhiều khó khăn. Hiện tượng sốt phát ban hoàn toàn không điển hình cho bệnh và hầu hết các trường hợp nhiễm đều được phát hiện sau lâm sàng. Do đó các xét nghiệm sinh hóa miễn dịch dựa vào sự xuất hiện chỉ số IgM cao hoặc chỉ số IgG tăng nhanh là yếu tố chính cho thấy thai phụ đã bị nhiễm. Tuy nhiên, chỉ dựa vào dấu hiệu lâm sàng cũng như các yếu tố miễn dịch các nhà khoa học cũng khó có khả năng đưa ra kết luận chính xác về khả năng nhiễm virus Rubella của thai nhi ở những bà mẹ có khả năng bị nhiễm. Chính vì vậy, sự ra đời của kỹ thuật RT-PCR là một bước tiến lớn góp phần vào việc chẩn đoán sớm nhiễm virus của thai nhi dựa vào nguyên lý khuếch đại đoạn gen bảo thủ của virus được phân lập từ mẫu bệnh phẩm (dịch ối, gai rau, máu cuống rốn) trên cơ sở thiết kế cặp mồi bổ sung đặc hiệu có gắn huỳnh quang. Kèm theo các mẫu chứng âm (huyết thanh không mang virus), chứng dương (huyết thanh mang virus) được đưa ra như một ví dụ cụ thể để khẳng định không có yếu tố ức chế phản ứng (Hình 1)

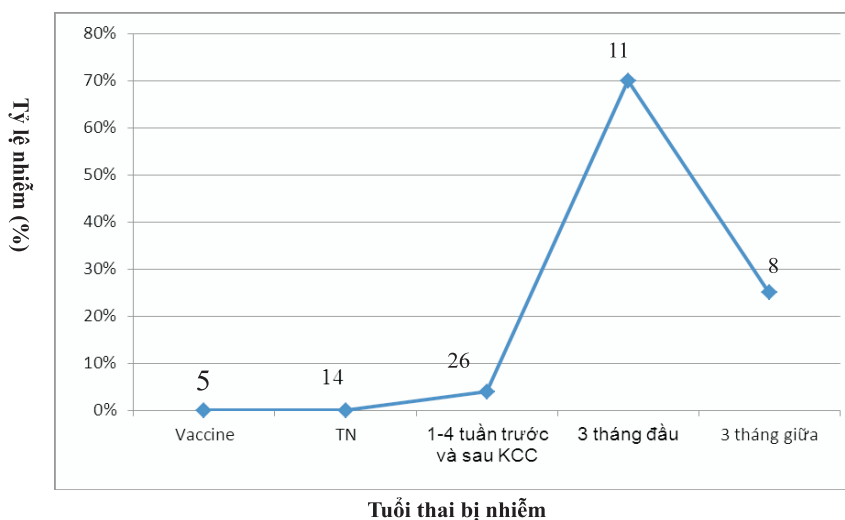


Hình 1: Phát hiện genome của virus Rubella bằng RT-PCR

Ảnh hưởng của thời kỳ nhiễm đến tỷ lệ nhiễm ở thai nhi

Nếu nhiễm virus Rubella tiền phát trong quá trình mang thai, loài virus này có thể sẽ xâm nhập vào bánh rau, qua máu rồi lan rộng đến các mô, cơ quan khác của thai nhi và giải phóng virus vào dịch ối. Tùy vào thời điểm nhiễm của thai kỳ mà thai nhi có thể mang virus hoặc không. Theo kết quả trên của nghiên cứu này, trong số 74 trường hợp có khả năng bị nhiễm, 70 - 75% số ca phát hiện thấy hệ gen của virus Rubella trong mẫu dịch ối khi thai phụ bị nhiễm ở 3 tháng đầu của

thời kỳ mang thai. Và tỷ lệ nhiễm của thai nhi giảm dần khi người mẹ có khả năng nhiễm ở 3 tháng thứ 2 của thai kỳ (25%). Trong số các thai phụ có biểu hiện nhiễm virus Rubella ở giai đoạn 1 đến 4 tuần trước và sau kỳ kinh cuối thì khả năng nhiễm virus ở thai nhi là 4% (Bảng 1). Một điều đặc biệt là các trường hợp tiêm vaccine từ 1 - 4 tuần trước kỳ kinh cuối cùng đều không phát hiện thấy genome của virus trong dịch ối. Điều này đưa ra cho chúng ta 1 kết luận về khả năng nhiễm của thai nhi ở giai đoạn nhiễm theo nghiên cứu là 0% (Hình 2).



Hình 2: Tỷ lệ nhiễm theo tuổi thai

Hội chứng Rubella bẩm sinh

Theo nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra khả năng nhiễm virus Rubella của thai nhi nhưng không mang hội chứng Rubella bẩm sinh. Và nghiên cứu này của chúng tôi đã chỉ ra 1 trong số 8 trường hợp mẫu dịch ối dương tính với loài virus này nhưng thai nhi vẫn phát triển bình thường và không mang hội chứng Rubella bẩm sinh sau sinh (~20%). Một ca trong số đó có mang biểu hiện của hội chứng Rubella bẩm sinh sau sinh do nguyên vọng giữ thai của gia đình. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng chỉ ra, trong số 52 mẫu dịch ối âm tính với virus Rubella, 100% thai nhi không mang hội chứng Rubella bẩm sinh sau sinh (Bảng 2). Như vậy, kết quả này đã đóng góp 1 phần không thể thiếu cho tính chính xác của kỹ thuật RT-PCR trong chẩn đoán sớm nhiễm virus Rubella ở thai nhi. Đồng thời cũng chỉ ra cho chúng ta thấy vẫn còn tồn tại 1 tỷ lệ nhỏ thai nhi bị nhiễm nhưng hoàn toàn không mang hội chứng Rubella bẩm sinh.

Số mẫu	Genome Rub.	CRS
52	-	0/52
01	+	0/1
01	+	1/1
06	+	Đình chỉ thai nghén

Bảng 2: Hội chứng Rubella bẩm sinh (CRS)
Kết luận

Nhiễm Rubella ở thời kỳ mang thai có thể mang lại hậu quả dị tật bẩm sinh nặng nề cho trẻ nhỏ. Để ngăn chặn hậu quả này, phát hiện sớm nhiễm Rubella bằng kỹ thuật RT-PCR là thực sự cần thiết. Các biện pháp điều trị cho thai nhi bị nhiễm là vô cùng hạn chế do vậy chẩn đoán sớm trước sinh là 1 trong những con đường hữu hiệu nhất để ngăn chặn các trường hợp mang hội chứng Rubella bẩm sinh hiện nay. Bên cạnh đó cũng giúp chúng ta tránh được các trường hợp phá thai không mong muốn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. J E Banatvala, D W G Brown. Lancet 2004; 363: 1127–37
2. Transactions of the International Congress of Medicine. International Congress of Medicine, 1881: 14–34.
3. Forbes JA. Rubella: historical aspects. Am J Dis Child 1969; 118: 5-11
4. McAlister Gregg N. Congenital cataract following German measles in mother. Trans Ophthalmol Soc Aust 1941; 3: 35–46.
5. Banatvala JE, Best JM. Rubella. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, eds. Principles and practice of clinical virology. London: John Wiley, 2000: 387–418.
6. Weller TH, Neva FA. Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella-like illness. Proc Soc Exp Biol Med 1962; 111: 225–30.
7. Public health service advisory committee on immunisation practices. Rubella virus vaccine recommendation on immunisation practice: a pre-licensing statement. Ann Intern Med 1969, 70: 1239–41.
8. Li Jin* and Brenda Thomas. Application of Molecular and Serological Assays to Case Based Investigations of Rubella and Congenital Rubella Syndrome. Journal of Medical Virology 79:1017–1024 (2007).
9. Shigetaka Katow. Rubella Virus Genome Diagnosis during Pregnancy and Mechanism of Congenital Rubella. Intervirology 1998;41:163–169.