

chương trình đề ra (70%). Tỷ lệ trạm y tế xã có nước sạch và nhà tiêu HVS tăng từ 70,3% năm 2008 lên 80,1% năm 2011, thấp hơn mục tiêu chương trình NTP2 gần 20%.

2. Chỉ có 17% số xã đạt mục tiêu có trên 65% số hộ sử dụng nhà tiêu HVS.

3. Trong giai đoạn 2009 - 2011, chương trình đã hỗ trợ xây dựng được 1.650 nhà tiêu HVS cho 10 xã.

4. Các hoạt động truyền thông giáo dục, tập huấn nâng cao trình độ đảm bảo tiến độ, góp phần nâng cao nhận thức của cán bộ và nhân dân các địa phương phương triển khai chương trình.

Kiến nghị: Từ kết quả trên cho thấy, tỷ lệ sử dụng nhà tiêu HVS hộ gia đình nông thôn, tỉ lệ sử dụng nước sạch và nhà tiêu HVS trạm y tế xã ở Nghệ An chưa đạt mục tiêu chương trình đề ra và thấp hơn bình quân của cả nước. Với đặc thù là tỉnh có diện tích lớn, địa bàn phức tạp, người dân còn nhiều tập quán vệ sinh lạc hậu đặc biệt là vùng sâu vùng xa, vùng ven biển. Để chương trình triển khai có hiệu quả cao, trong thời gian tới cần quan tâm đẩy mạnh công tác

tuyên truyền về các chương trình vay vốn ưu đãi cho mục tiêu vệ sinh hộ gia đình. Thông tin, giáo dục, truyền thông nâng cao nhận thức và trách nhiệm của người dân trong sử dụng nước sạch, nhà tiêu hợp vệ sinh. Đào tạo nguồn nhân lực tại chỗ lực cho lĩnh vực Nước sạch và Vệ sinh môi trường, đặc biệt cho các khu vực nông thôn, vùng sâu, vùng xa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **ADB, 2010**, Báo cáo đánh giá, chiến lược và lộ trình Cấp nước và Vệ sinh của Việt Nam.
2. **BỘ Y tế, 2011** Báo cáo chương trình mục tiêu quốc gia nước sạch và vệ sinh môi trường nông thôn giai đoạn 2011 - 2015.
3. **BỘ Y tế, Vệ sinh môi trường nông thôn Việt Nam**, Nhà xuất bản Y học, 2007.
4. **Cục quản lý Môi trường y tế & UNICEF, 2010**, Báo cáo nghiên cứu mối liên quan giữa vệ sinh môi trường, nguồn nước hộ gia đình và hành vi vệ sinh chăm sóc trẻ của bà mẹ với tình trạng dinh dưỡng của trẻ dưới 5 tuổi tại Việt Nam.

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ARN RUBELLA BẰNG KỸ THUẬT NESTED RT - PCR

Nguyễn Duy Bắc¹, Nguyễn Thị Hương¹, Đặng Tiến Trường¹

TÓM TẮT

Rubella thuộc họ Togaviridae, vật chất di truyền là ARN. Dịch sốt Rubella ở Việt Nam trong thời gian gần đây bùng phát phức tạp, dịch bùng phát có chu kỳ 5 năm. Chẩn đoán nhanh và chính xác rubella giúp kiểm soát, dịch hiệu quả, đặc biệt trong chẩn đoán rubella trước sinh. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật Nested RT-PCR được thiết lập để xác định ARN của vi rút *Rubella*, chẩn đoán nhiễm virus. Kỹ thuật Nested RT-PCR giúp phát hiện nhanh, chính xác nhiễm rubella.

Từ khóa: *Nested RT-PCR, RNA, virus Rubella.*

SUMMARY

DETECTION OF RUBELLA ARN USING NESTED RT-PCR

Rubella is Togaviridae family, ARN virus. Recent years, the outbreaks of Rubella fever in Vietnam was complicated. Cycle of epidemic is 5-year. Rapid and accurate diagnosis is good for effective

control of outbreaks, especially in prenatal diagnosis. In this study, nested RT-PCR technique was established for detecting ARN of rubella virus, diagnosis of viral infection. This technique can detect rubella rapidly and exactly.

Key words: *Nested RT-PCR, RNA, Rubella virus.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rubella được xếp vào chi Rubivirus thuộc họ Togaviridae, có quan hệ gần với các Arbovirus nhóm A. Virus rubella chứa vật liệu di truyền là ARN, có vỏ bọc. Chỉ có duy nhất một type kháng nguyên, không phản ứng chéo với các thành viên khác trong nhóm Togavirus [4].

Chẩn đoán rubella bằng lâm sàng không đáng tin cậy vì rubella chỉ là một trong số rất nhiều nguyên nhân gây sốt có phát ban khác như vi rút sởi, dengue, parvovirus B19, Chikungunya [5]. Chẩn đoán nhiễm rubella cấp tính chủ yếu

¹ Học viện Quân y

Phản biện khoa học: GS.TS. Lê Gia Vinh

dựa vào phương pháp phát hiện hiệu giá kháng thể IgM, chuyển đảo huyết thanh từ IgG (-) sang IgG (+). Tuy nhiên, tỷ lệ âm tính giả và dương tính giả khá cao do xác định thời điểm xét nghiệm không chính xác. Xác định nhanh, chính xác nhiệm vụ rút rubella đặc biệt quan trọng trong chẩn đoán rubella ở phụ nữ mang thai [7]. Việc chẩn đoán nhiệm vụ rút rubella bằng phân lập virus chính xác nhưng cần nhiều thời gian, trang thiết bị hiện đại, trình độ kỹ thuật chuyên sâu. Kỹ thuật sinh học phân tử xác định ARN vi rút rubella có được ưu điểm của cả phương pháp phân lập vi rút và huyết thanh học, đảm bảo xác định chính xác, nhanh, không phức tạp, thực hiện ở nhiều loại mẫu khác nhau, có thể triển khai rộng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xây dựng qui trình kỹ thuật nested RT-PCR xác định ARN rubella đơn giản, nhanh, chính xác và kinh tế.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- 03 mẫu vi rút rubella do viện Vệ sinh - Dịch tễ trung ương phân lập và nuôi cấy.

- Mẫu vi rút sởi, dengue, parvovirus B19, Chikungunya (gây triệu chứng phát ban giống rubella) do viện Pasteur Nha Trang cung cấp.

2.2. Primer cho phản ứng nested RT-PCR

Primer của phản ứng nested RT-PCR được thiết kế bằng phần mềm Primer 3 version 4.0. Trình tự primer thuộc đoạn gen E1 của vi rút rubella được khai thác từ ngân hàng gen Mỹ, NCBI (National Center for Biotechnology Information). Primer cho phản ứng RT-PCR: Ru1F_A: 5' CAACACGCCGACGACAAC 3' và Ru1R: 5' CCACAAGCCGAGCAGTCA -3'; Primer cho phản ứng nested PCR: Ru2F: 5'-CTCGAGTCCAG GTCCTGCC -3', Ru2R 5'-GAATGG CGT TGGCAAACGG -3'.

Sản phẩm của phản ứng nested RT-PCR theo lý thuyết là 143 bp.

2.3. Tách chiết ARN.

ARN của virus được tách từ 140 µl dịch chứa tế bào nhiễm vi rút sau nuôi cấy, bằng bộ kit Qiagen ARN mini, theo quy trình chuẩn của nhà

sản xuất (Qiagen, Đức), ARN tách chiết được lưu trữ ở -80°C cho tới khi sử dụng.

2.4. Phản ứng khuếch đại gen Nested RT-PCR

Phản ứng RT-PCR: ARN được chuyển thành cDNA và nhân DNA đích nhờ phản ứng RT-PCR bằng bộ Kit Qiagen onestep (Qiagen-Đức). Thể tích phản ứng gồm: 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 10µl; hỗn hợp dNTP: 2 µl; Q solution: 10 µl; enzym mix 2 µl; Primer Ru1F 1µl; Primer Ru1R 1 µl; mẫu ARN: 2 µl; H₂O vừa đủ 50 µl. Chu trình nhiệt gồm các giai đoạn như sau: chuyển đổi ARN thành cDNA ở 60°C trong 30 phút, sau đó biến tính 95°C ở 15 phút; thực hiện 40 chu kỳ gồm các giai đoạn: ủ xoắn ở 94°C trong 30 giây, bám mỗi 57°C trong 30 giây, kéo dài 72°C trong 1 phút. Cuối cùng là giai đoạn kéo dài 72°C trong 10 phút.

- Phản ứng Nested PCR: Thành phần phản ứng gồm: Buffer 10X 2,5 µl; hỗn dịch dNTP 0,3 µl; Primer Ru2F 0,5 µl; Primer Ru2R 0,5 µl; KAPA Tag Polymerase 0,1 µl; 2 µl sản phẩm của phản ứng RT-PCR; H₂O vừa đủ 25 µl. Chu trình nhiệt gồm các giai đoạn như sau: biến tính 95°C ở 15 phút; thực hiện 30 chu kỳ gồm các giai đoạn: ủ xoắn ở 94°C trong 30 giây, bám mỗi 62°C trong 30 giây, kéo dài 72°C trong 1 phút. Cuối cùng là giai đoạn kéo dài 72°C trong 10 phút. Sau khi nhân DNA đích, sản phẩm DNA được điện di trên agarose gel 2% và phân tích kết quả. Sản phẩm DNA của phản ứng nested RT-PCR theo lý thuyết là 143 bp.

2.5. Thiết bị, hóa chất

2.5.1. Thiết bị: dụng cụ và thiết bị chuyên dụng được sử dụng tại Trung tâm nghiên cứu Y Dược học - Học viện Quân y gồm: máy luân nhiệt tự động GeneAmp PCR system 9700 AB (Applied Biosystems, Hoa Kỳ), máy ly tâm lạnh Mikro 22R (Hettich, Đức), máy soi và chụp gelDoc (Hoa Kỳ), bộ điện di của Bio Rad.

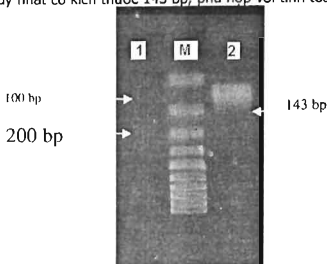
2.5.2. Hóa chất: Qiagen ARN mini kit, Kit Qiagen onestep, Primer do hãng Invitrogen tổng hợp, nước khử ion, Agarose, thang DNA chuẩn do hãng Sigma cung cấp.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả xác định ARN bằng phản ứng nested RT-PCR

Sau quá trình tối ưu hóa thành phần, chu trình nhiệt phản ứng RT-PCR và phản ứng nested PCR, chúng tôi đưa ra được nhiệt độ gắn mỗi phản ứng RT là 60°C, nhiệt độ gắn mỗi phản ứng PCR vòng

1 là 57°C, nhiệt độ gắn mỗi phản ứng PCR vòng 2 là 60°C. Sau khi điện di trên gel agarose 2%, kết quả thu được 01 băng duy nhất có kích thước 143 bp, phù hợp với tính toán lý thuyết (hình 1).



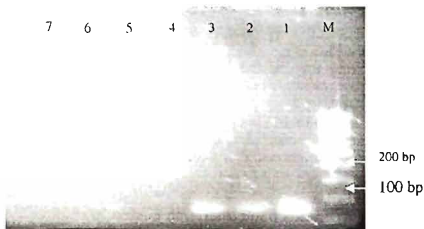
Hình 1: Kết quả xác định ARN của rubella.
1. H₂O; 2. Virus Rubella; M marker 100 bp.

Trình tự ARN của vi rút rubella có tỷ lệ GC lớn, nhiệt độ gắn primer khá cao, được cho là khó khuếch đại. Vì vậy, chúng tôi bổ sung Q-Solution của bộ kit One step RT-PCR của Qiagen, thành phần bổ sung giúp phản ứng nhân gen diễn ra được chính xác hơn.

3.2. Tính đặc hiệu của phản ứng nested RT-PCR

Để đánh giá tính đặc hiệu của kỹ thuật nested RT-PCR, chúng tôi tiến hành phản ứng nested RT - PCR trên mẫu vi rút sởi (ARN), vi rút Dengue (ARN), vi rút parvovirus B19 (DNA) và vi rút Chikungunya (ARN). Các vi rút trên và rubella gây gây triệu chứng lâm sàng điển hình giống nhau gồm sốt, phát ban, viêm tổ chức liên kết.

Tuy nhiên chỉ có vi rút rubella gây dị tật cho thai nhi khi bị nhiễm rubella bẩm sinh [5], [9]. Trong thực tế, các tác nhân gây sốt này dễ bị nhầm với rubella, điều này có thể gây hoang mang cho người phụ nữ mang thai. Ngoài ra, vi rút Chikungunya và rubella cùng thuộc họ Togaviridae vi rút, chikungunya có liên quan gần với vi rút rubella về mặt di truyền [7]. Kết quả ở hình 2 cho thấy, các băng đặc hiệu chỉ xuất hiện ở các mẫu vi rút rubella, không thấy xuất hiện băng ở các mẫu khác. Điều này cho thấy primer được thiết kế đặc hiệu với vi rút rubella và không bắt cặp chéo với các trình tự của các vi rút gây các triệu chứng tương tự rubella.



Hình 2: Kết quả xác định ARN của rubella.
1, 2, 3. Virus Rubella; 4, 5, 6, 7: lần lượt vi rút sởi, Dengue, parvovirus B19, Chikungunya; M marker 100 bp

Năm 2010- 2011, dịch sốt rubella bùng phát phức tạp ở Việt Nam. Đặc biệt, bệnh lây lan rộng, nhiều phụ nữ mang thai nhiễm bệnh. Do chưa có công cụ chẩn đoán nhanh, đặc biệt là chẩn đoán trước sinh nhiễm rubella bẩm sinh, kết hợp với cộng đồng thiếu thông tin về rubella đã gây tâm lý hoang mang, lo lắng. Hơn nữa, có rất nhiều phụ nữ mang thai phải đình chỉ thai nghén không có cơ sở chẩn đoán chính xác, khoa học. Vì vậy yêu cầu cần một công cụ chẩn đoán nhanh, chính xác giúp cho việc kiểm soát dịch, hạn chế việc đình chỉ thai nghén không cần thiết [3].

Để phát hiện virus Rubella trong lâm sàng, một số phương pháp được thực hiện thường quy ở labo như: phân lập virus, phát hiện kháng thể của vi rút và vật chất di truyền bằng các kỹ thuật sinh học phân tử [7]. Phương pháp phân lập virus được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán nhưng tốn nhiều thời gian, trang thiết bị hiện đại, trình độ chuyên sâu, chỉ có thể thực hiện được ở một số phòng thí nghiệm trọng điểm. Hơn nữa phân lập virus cũng gặp khó khăn nồng độ vi rút thấp dễ dẫn tới âm tính giả. Phương pháp huyết thanh học, phát hiện IgM và IgG kháng virus Rubella phát hiện nhanh, dễ sử dụng, không đòi hỏi kỹ thuật viên có trình độ cao và có thể làm ngoài labo. Nhưng kỹ thuật huyết thanh học cần phải được chỉ định đúng thời gian, tránh hiện tượng âm tính giả do chỉ định quá sớm hoặc quá muộn (chẩn đoán bằng IgM), dẫn tới bỏ sót người mắc bệnh. Bên cạnh đó, kỹ thuật huyết thanh học có nhiều nhược điểm như chỉ có thể áp dụng ở tuổi thai lớn hơn 22 tuần, tỷ lệ âm tính giả vẫn còn cao do nồng độ kháng thể thấp trong máu cuống rốn của thai nhi và bắt buộc phải lấy máu cuống rốn của thai nhi, một kỹ thuật thực tạp chỉ được tiến hành tại một số ít bệnh viện chuyên về sản khoa.

Nested RT-PCR có nhiều ưu điểm so với cả phương pháp phân lập vi rút và phương pháp

huyết thanh học về cả độ chính xác, thời gian pháp hiện sớm hơn, nhanh hơn, đặc biệt có thể áp dụng trong chẩn đoán trước sinh nhiễm rubella bẩm sinh trên mẫu dịch ối. Kỹ thuật có độ đặc hiệu cao và độ nhạy tốt hơn kỹ thuật real time PCR.

V. KẾT LUẬN

Kỹ thuật Nested RT-PCR phát hiện được ARN của vi rút rubella nhanh chóng, chính xác, giá thành thấp, không đòi hỏi trang thiết bị hiện đại, có thể áp dụng với nhiều cơ sở nghiên cứu cũng bệnh viện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Văn Bắc và cs(2007), "Đặc điểm dịch tễ, lâm sàng bệnh Rubella tại thành phố Hồ Chí Minh, năm 2007", *Tạp chí Y học thực hành* 561, pp. 4.
2. Phạm Thị Hải Châu và cs (2005), "Bệnh rubella và thai kỳ", *Tạp chí Y học thực hành*.
3. Nguyễn Văn Thường, Triệu Thị Thái, Phùng Nhã Hạnh, Nguyễn Văn Bằng (2012), Hội chứng Rubella bẩm sinh tại Hà Nội sau vụ dịch đầu năm 2011, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*.
4. Banatvala J. E., Brown D. W. (2004), "Rubella", *Lancet*, 363(9415), pp. 1127-37.
5. Bosma T. J., Corbett K. M., Eckstein M. B., O'Shea S., Vijayalakshmi P., Banatvala J. E., Morton K., Best J. M. (1995), "Use of PCR for prenatal and postnatal diagnosis of congenital rubella", *J Clin Microbiol*, 33(11), pp. 2881-7.
6. Cradock-Watson J. E., Ridehalgh M. K., Anderson M. J., Pattison J. R., Kangro H. O. (1980), "Fetal infection resulting from maternal rubella after the first trimester of pregnancy", *J Hyg (Lond)*, 85(3), pp. 381-91.
7. Cutts F. T., Robertson S. E., Diaz-Ortega J. L., Samuel R. (1997), "Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries, Part 1: Burden of disease from CRS", *Bull World Health Organ*, 75(1), pp. 55-68.