

ĐẶT VẤN ĐỀ

Human Papillomavirus (HPV) là tác nhân thường gặp nhất trong các nhiễm trùng lây truyền qua đường tình dục và là nguyên nhân quan trọng dẫn tới ung thư cổ tử cung (UTCTC), loại ung thư đứng hàng thứ hai trong các loại ung thư ở nữ giới [1].

Hàng năm trên thế giới, ước tính có khoảng 529.000 ca mắc mới UTCTC, tử vong khoảng 275.000 trường hợp, trong đó 85% tổng số các trường hợp bệnh gặp ở những nước đang phát triển [2]. Mỗi năm, Châu Á có thêm khoảng 312.000 bệnh nhân UTCTC, chiếm 59% trường hợp mắc mới trên toàn thế giới đặc biệt ở khu vực Nam Á và Đông Nam Á, nơi có tỷ lệ nhiễm HPV cao nhất trong châu lục [1], [2]. Cùng với sự tăng nhanh tỷ lệ nhiễm HPV trong cộng đồng, UTCTC thực sự trở thành gánh nặng bệnh tật toàn cầu, gây ảnh hưởng nặng nề đến sức khỏe và tâm lý của nữ giới.

HPV thuộc họ Papillomaviridea với hơn 200 genotype khác nhau về vật liệu di truyền trong đó đã được xác định khoảng 100 genotype, và khoảng 40 genotype HPV đã được xác định ở niêm mạc đường sinh dục người [3], [4]. Những genotype HPV "nguy cơ cao" gây tăng sinh, loạn sản và gây biến đổi tế bào cổ tử cung dẫn đến ung thư thường thuộc loại alpha mucosotropic -5, -6, -7, -9, -11 [5], [6]. Tám genotype HPV (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -45, -52, và -58) được thống kê là những genotype phổ biến nhất, có liên quan tới hơn 90% các trường hợp UTCTC trên toàn thế giới và riêng HPV-16, -18 gặp ở 70% các trường hợp [7], [8].

HPV không chỉ có mối liên quan mật thiết với UTCTC mà còn có vai trò quan trọng trong sự hình thành ung thư hậu môn, âm hộ, âm đạo, dương vật, ung thư phổi và một số ung thư vùng hầu họng. Đồng thời, HPV còn là nguyên nhân của nhiều bệnh cảnh lâm sàng trên da và niêm mạc như hạt cơm, sùi mào gà sinh dục-hậu môn, u nhú thanh quản trẻ sơ sinh...[9].

Hiện nay, vắc xin phòng chống HPV-16 và HPV-18 đã góp phần đáng kể trong việc giảm tỷ lệ UTCTC trên thế giới. Tuy nhiên, sự phân bố các genotype HPV lại thay đổi theo từng vùng địa lý và theo từng sắc tộc khác nhau

[10]. Hơn nữa, khả năng bảo vệ chéo của vắc xin phòng chống HPV-16, -18 được chứng minh là kém hiệu quả hơn đối với các genotype "nguy cơ cao" khác (dưới 1%) [11], [12]. Theo kết quả nghiên cứu dịch tễ học, HPV-16 và HPV-18 là những genotype phổ biến nhất tại châu Âu và châu Mỹ [13], ngược lại ở châu Á, HPV-16, HPV-52 và HPV-58 là những genotype chiếm tỷ lệ cao nhất [14]. Tại Nhật Bản, Philippine, Đài Loan và tỉnh Chiết Giang phía nam Trung Quốc, HPV-52 được xác định là genotype HPV thường gặp nhất [15], [16], [17], [18]. Vì vậy, nghiên cứu về sự phân bố dịch tễ học genotype HPV liên quan tới sự biến đổi tế bào theo vùng địa lý và chủng tộc là những thông tin rất cần thiết cho chương trình triển khai vắc xin phòng chống HPV và kế hoạch triển khai các phương pháp phát hiện, sàng lọc sớm HPV trong cộng đồng.

Tại Việt Nam, theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới năm 2010, UTCTC hiện đang là loại ung thư chiếm tỷ lệ cao nhất ở nữ giới lứa tuổi 15 - 44, với hơn 6000 ca nhiễm mới (tỷ lệ: 11,7 trên 100,000 phụ nữ) và tử vong hơn 3000 trường hợp mỗi năm [1]. Điều đặc biệt quan tâm là phần lớn các trường hợp UTCTC thường được phát hiện ở giai đoạn muộn, trong khi quá trình diễn tiến từ nhiễm vi rút đến ung thư thường trải qua trong một thời gian dài. Quá trình tiến triển từ mức độ loạn sản nhẹ, loạn sản vừa, loạn sản nặng đến ung thư tại chỗ (giai đoạn tổn thương có thể phục hồi) và đến giai đoạn ung thư xâm nhập có thể kéo dài từ 10 - 25 năm [19]. Đây chính là cơ hội có ý nghĩa cho việc phát hiện nhiễm HPV, sàng lọc những người có nguy cơ mắc UTCTC nhằm giúp quá trình điều trị hiệu quả các tổn thương tiền ung thư và ung thư giai đoạn sớm. Tuy nhiên, ở Việt Nam xét nghiệm tế bào mô bệnh học (xét nghiệm Pap smear) và phát hiện HPV DNA còn chưa phổ biến rộng rãi [20]. Hơn nữa, các kết quả nghiên cứu về sự phân bố dịch tễ học HPV trong cộng đồng còn hạn chế [14].

Với tầm quan trọng và ý nghĩa của việc các định genotype HPV cũng như xuất phát từ thực tiễn nêu trên, đề tài "**Xác định tỷ lệ nhiễm và genotype của Human Papillomavirus trên gái mại dâm tại Hải Phòng, Việt Nam**" được thực hiện với các mục tiêu sau:

1. *Xác định tỷ lệ nhiễm Human Papillomavirus và một số yếu tố liên quan trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng, Việt Nam.*
2. *Khảo sát sự phân bố genotype của HPV ở gái mại dâm nhiễm HPV.*
3. *Đánh giá sự liên quan giữa sự biến đổi tế bào cổ tử cung và các genotype HPV.*

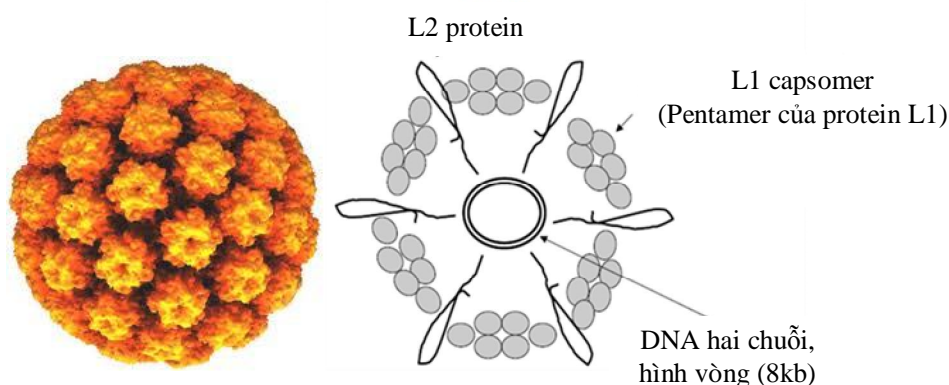
CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Đặc điểm chung của Human Papillomavirus (HPV)

1.1.1. Hình thái và cấu trúc của HPV

HPV là nhóm vi rút có kích thước nhỏ, họ Papillomaviridae, không vỏ, đối xứng xoắn ốc. Hạt vi rút có đường kính 52 - 55nm, vỏ gồm 72 đơn vị capsomer. Mỗi đơn vị capsid gồm một pentamer của protein cấu trúc L1 kết hợp với một protein L2 (protein này là thành phần kháng nguyên được sử dụng trong phản ứng miễn dịch đặc hiệu).



Hình 1.1. Hạt vi rút của HPV

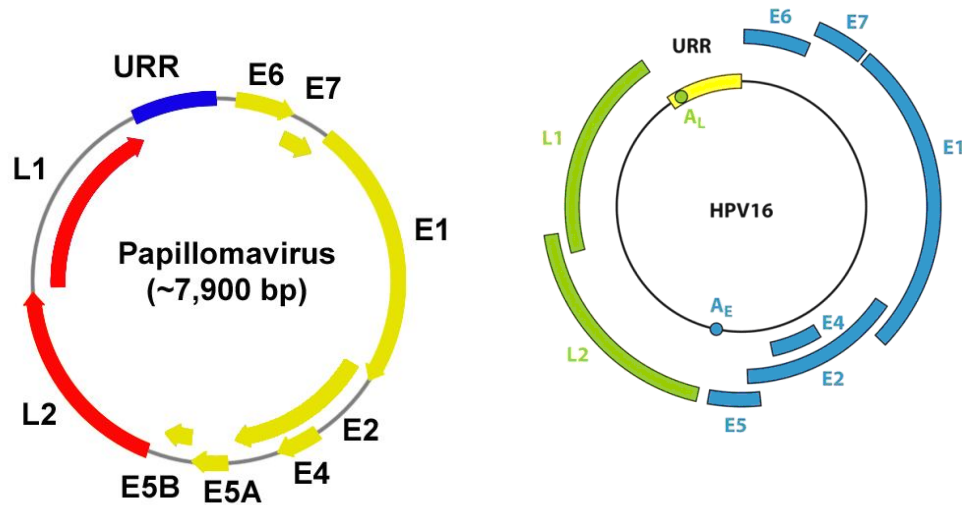
Cả hai protein cấu trúc đều do vi rút tự mã hóa: Protein capsid chính (L1) có kích thước khoảng 55 kDa và chiếm khoảng 80% tổng số protein của vi rút. Protein capsid phụ (L2) có kích thước khoảng 70 kDa [3].

1.1.2. Đặc điểm cấu trúc và chức năng các gen của HPV

1.1.2.1. Đặc điểm cấu trúc

HPV có vật liệu di truyền là DNA, một mạch đôi không hoàn chỉnh, tồn tại dạng siêu xoắn hình vòng (circular ds-DNA). Bộ gen của vi rút chiếm khoảng 12% trọng lượng của hạt vi rút, chiều dài từ 7800 đến 8000 cặp base (bp) trong đó guanosine và cytosine chiếm 42%. DNA của vi rút liên kết với histone của tế bào chủ tạo thành cấu trúc phức hợp giống Chromatin (Chromatin-like complex).

Cấu trúc bộ gen của nhóm Papillomavirus nói chung tương tự nhau ở các loài vật chủ, tất cả các khung đọc mở ORF (Open Reading Frame) của vi rút đều trên một chuỗi DNA. Điều này có nghĩa là tất cả các gen của vi rút nằm trên một mạch DNA và quá trình phiên mã xảy ra trên một mạch duy nhất. Bộ gen của HPV có 10 khung đọc mở ORF được chia làm hai loại là khung đọc mở sớm và khung đọc mở muộn tùy theo vị trí của ORF trong bộ gen [21].



Hình 1.2. Cấu trúc bộ gen của Papillomavirus và HPV 16 [3]

Bộ gen của HPV được chia làm ba vùng quan trọng [21]:

1. Vùng điều hòa thượng nguồn URR (Upstream Regulatory Region) hay còn được gọi là vùng điều hòa dài LCR (Long Control Region), chứa DNA không mã hóa, có chức năng điều hòa quá trình sao chép DNA và quá trình phiên mã. Đây là vùng biến động nhất, chiếm khoảng 10% chiều dài của bộ gen, tương đương 800 đến 1000 bp tùy theo từng genotype khác nhau.

Trình tự vùng URR bao gồm:

- Trình tự tăng cường: là nơi gắn của các nhân tố phiên mã như AP-1, NF1, otc 1, TEF1, TEF2, YY1...
- Promoter bao gồm cấu trúc TATA và vùng khởi đầu cho quá trình phiên mã tổng hợp RNA (P97 ở HPV16 và P105 ở HPV18).
- Điểm khởi đầu sao chép ORI, các tiểu phần kích hoạt và một số chuỗi gen câm (Silencing gene)...

2. Vùng gen sớm (Early region): Gồm 6 gen, ký hiệu là E1, E2, E4, E5, E6, E7 và các khung đọc mở ORF. Sản phẩm của vùng gen này là các protein chức năng giúp cho quá trình nhân lên của DNA vi rút, gây hiện tượng tăng sinh tế bào và gây biến đổi tế bào, hình thành tế bào bất tử.

3. Vùng gen muộn (Late region): Gồm 2 gen tổng hợp protein L1 và L2, là những protein cấu trúc capsid của vi rút. Đây là vùng gen mã hóa muộn hơn, do đó vùng chứa gen L1 và gen L2 còn được gọi là vùng sao chép muộn.

1.1.2.2. Chức năng các gen và sản phẩm của gen HPV

- Chức năng gen E1

HPV là vi rút sử dụng hoàn toàn các thành phần tế bào chủ để sao chép DNA. Gen E1 là một trong hai vùng gen bảo tồn nhất của HPV (cùng với L1) mã hóa các protein chức năng có vai trò cần thiết cho quá trình sao chép DNA và plasmid. Gen E1 gắn vào vị trí khởi đầu của quá trình nhân lên (ori), thực hiện quá trình chia tách DNA (helicase) và giúp các chuỗi gen của vi rút duỗi ra trong quá trình sao chép. Hoạt động tháo xoắn của gen E1 không phụ thuộc ATP.

Tại cơ thể sống, gen E1 và E2 đóng vai trò quan trọng trong điều chỉnh quá trình nhân lên của vi rút. Gen E2 còn có khả năng gắn với chuỗi DNA đặc hiệu (vị trí gắn E2 - E2BSs) và protein E1. Tuy nhiên, cả hai chức năng của E2 đều do gen E1 điều chỉnh. Trong quá trình sao chép vi rút, có nhiều thành phần tế bào phụ thuộc gen E1 như DNA polymerase, chaperone protein, histone H1 và yếu tố sao chép A vì gen E1 có khả năng trực tiếp thúc đẩy các thành phần này.

- Chức năng gen E2

Ngoài chức năng trong sao chép DNA của vi rút, gen E2 còn đóng vai trò chủ đạo trong quá trình phiên mã cũng như trong quá trình điều hòa giải mã và duy trì chuỗi gen vi rút ở ngoài nhiễm sắc thể. Chức năng điều hòa giải mã của gen E2 được thực hiện do sự gắn kết với E2BSs trong chuỗi gen của vi rút có ái lực với gen E2 và những vị trí liên quan này xác định hiệu quả của gen E2 trong quá trình giải mã.

Ở chuỗi gen của HPV nhóm "nguy cơ cao", gen E2 có khả năng ức chế quá trình sao chép từ yếu tố thúc đẩy bộc lộ các gen sớm của vi rút, do đó khi gen HPV nhóm "nguy cơ cao" xâm nhập vào nhiễm sắc thể vật chủ sẽ làm tăng khả năng bộc lộ gen gây ung thư E6 và E7.

- Chức năng gen E1^{E4}

Giống như các protein khác của HPV, protein điều hòa E1^{E4} là sản phẩm được tạo ra từ mRNA kết nối khi vòng mở dịch chuyển gen E1 và E4, có chức năng giúp cho quá trình trưởng thành và phóng thích vi rút ra khỏi tế bào mà không làm tan tế bào chủ.

Gen E1^{E4} chứa 3 dạng chính tác động vào chu kỳ sống của vi rút gồm: (1) Dạng gen chứa nhiều leucine ở đầu tận cùng N liên quan đến keratin và cần thiết cho nhân lên của DNA; (2) Vùng chứa nhiều proline ở đoạn trung tâm, chứa vị trí threonine cần thiết cho khoảng nghỉ của chu kỳ tế bào tại giai đoạn G2/M và giải mã của phức hợp cyclinB/cdk1 ở bào tương; (3) Đầu tận cùng C chứa domain đơn dạng kiểu niêm mạc và điều hòa khả năng gen E1^{E4} tạo ra sự oligomerize, gắn với DEAD-box RNA helicase và tạo ra sự phá vỡ hệ thống sợi keratin.

- Chức năng gen E5

Gen E5 mã hóa cho sản phẩm là protein E5, một protein chuỗi đôi kỵ nước, kích thước nhỏ nằm ở phần màng Golgi và lưới nguyên sinh chất của tế bào, cần thiết cho quá trình xâm nhập và tồn tại của vi rút trong tế bào chủ. Protein E5 là yếu tố tác động ngay trong giai đoạn đầu của quá trình xâm nhiễm, tạo ra các phức hợp với các thụ thể của yếu tố kích thích tăng trưởng và biệt hóa tế bào đồng thời giúp cho vi rút lẩn trốn đáp ứng miễn dịch của chủ thể.

Mặt khác, protein E5 còn có vai trò trong việc ngăn chặn sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào khi có sự sai hỏng do chính vi rút gây ra. Khả năng của E5 gây nên sự biến đổi của tế bào do gen E5 có khả năng hoạt hóa receptor của yếu tố phát triển và ức chế ATPase không bào.

- Chức năng gen E6 [4].

Gen E6 mã hóa cho protein E6, gồm khoảng 150 acid amin hình thành cấu trúc Cys-X-X-Cys gắn với kẽm (Zn) điều hòa, mã hóa cho khung đọc mở ORF đầu tiên trong chuỗi gen của HPV và là một trong các protein gây ung thư chính của HPV.

Ba chức năng chính của gen E6 cũng là ba chức năng rất nguy hiểm đối với tế bào vật chủ:

(1) Protein E6 của HPV nhóm “nguy cơ cao” liên kết hoặc không liên kết với protein E7 gây kích thích tế bào chủ phân chia mạnh mẽ và sự phân chia này là mãi mãi, gây bất tử hóa tế bào. Protein E6 có khả năng gây quá sản bằng cách ức chế chu kỳ nghỉ của vòng tế bào do sự phá hủy DNA và gây thúc đẩy sự tiến triển của tế bào. Khả năng gây ung thư của E6 được điều hòa bởi khả năng hoạt động như giá đỡ và điều hòa tương tác protein với protein. Một số tương tác protein mà được mã hóa trên chuỗi E6 gồm: p53, protein liên quan đến E6 (E6AP), protein gắn với E6 (E6BP), c-myc, p300/CBP, paxillin, protein PDZ, yếu tố điều hòa interferon 3 và đồng phân của Bcl-2 (Bak).

(2) Tương tác với p53 thông qua sự liên kết giữa E6 với E6AP bằng liên kết ligand, tạo ra thoái triển của p53 (yếu tố giải mã và ức chế ung thư, có vai trò điều hòa chính hoạt động ức chế tổng hợp DNA thông qua chu kỳ nghỉ của vòng tế bào).

Bình thường, khi có tín hiệu phá hủy tế bào hoặc có sự nhân lên sai của DNA, gen ức chế ung thư p53 được hoạt hóa sẽ chuyển vòng tế bào sang chu kỳ nghỉ hoặc gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis) thông qua hoạt động giải mã của gen.

Hơn nữa, E6 còn có khả năng gắn kết với protein PDZ dẫn đến sự thoái triển của protein PDZ, một protein được bảo tồn trong quá trình tiến hóa, cần thiết cho sự phát triển, kết dính, tăng sinh, biệt hóa và duy trì chu kỳ sống của tế bào.

(3) Liên kết với gen *ras* trong quá trình bất tử hóa tế bào và kích thích sự phát triển của NIH 3T3, đồng thời hoạt hóa promoter E2 của Adenovirus.

- Chức năng gen E7 [4], [7]

Protein E7 được mã hóa từ gen E7 gồm 98 acid amin, tuy nhỏ hơn protein E6 nhưng cũng có vai trò không kém phần quan trọng trong cơ chế gây ung thư ở tế bào chủ.

Hoạt động chức năng của E7 trong cơ chế gây ung thư do (1) protein E7 có vùng bảo tồn đầu tận cùng N và có domain gắn Kẽm ở đầu C giúp liên kết chặt chẽ hơn với E6, hỗ trợ nhau trong cơ chế gây bất tử hóa tế bào; (2) E7 chứa motif gắn protein pocket (LXCXE) giúp E7 gắn kết với các gen ức chế khối u (như pRb) hoặc gắn với 2 protein pocket khác là p107 và p130 làm giải phóng một số lượng lớn yếu tố phiên mã E2F tự do, kích thích quá trình phiên mã, kéo dài tuổi thọ tế bào.

Protein E7 của HPV nhóm “nguy cơ cao” cũng như của nhóm “nguy cơ thấp” đều có khả năng gắn kết với protein pocket. Tuy nhiên, sự ưu tiên gắn kết của protein E7 với protein pocket khác nhau giữa hai nhóm HPV. Ái lực liên kết này ở những type “nguy cơ cao” cao gấp 10 lần so với ở những type “nguy cơ thấp”.

Thông thường, pRb bị thủy phân sớm ở chu kỳ của tế bào. Ở giai đoạn phosphorin hóa, pRb gắn với yếu tố sao chép E2F/DP (phức hợp hoạt hóa sao chép điều khiển sự bộc lộ các gen ở giai đoạn S) gây ức chế quá trình hoạt hóa phức hợp sao chép. Sang giai đoạn G1 muộn, pRb được phosphorin hóa bởi phức hợp cyclin/cdk, giải phóng phức hợp E2F/DP do đó các gen thúc đẩy giai đoạn S được hoạt hóa và giải mã.

Trong trường hợp nhiễm HPV, sự bộc lộ gen E7 không cần quá trình phosphorin hóa pRb để hoạt hóa phức hợp sao chép E2F/DP. Sự kết hợp của E7 với pRb đã được khử phosphorin dẫn đến giải phóng phức hợp E2F/DP từ pRb và hoạt hóa tiếp theo của phức hợp E2F. Do đó, sự bất hoạt E7 của pRb tạo điều kiện cho HPV có khả năng vượt qua sự ức chế pRb trong chu kỳ tế bào.

- Chức năng gen L1 và L2

L1 và L2 là hai vùng gen cấu trúc còn gọi là vùng gen mã hóa muộn cho protein vỏ capsid chính và phụ. Trên kính hiển vi điện tử, vỏ capsid của HPV chứa 72 capsomere có cấu trúc vòng bảy cạnh trên hàng rào dạng lưới

icosahedral T=7 với kích thước đường kính khoảng 55nm. Gen L1 là vùng bảo tồn nhất của vi rút và được dùng để phát hiện cũng như trong phân loại Papillomavirus.

Thành phần của vỏ capsid vi rút gồm protein capsid chính L1, và capsid phụ L2. Khi chỉ gen L1 bộc lộ, có thể hình thành các hạt giả vi rút hoặc phân tử giống vi rút (Virus like particles, VLPs), các thành phần này khó phân biệt với vi rút thực sự và đóng vai trò quyết định trong sản xuất vi rút, sản xuất vắc xin. Nếu L2 bộc lộ cùng với L1, nó cũng góp phần tạo ra VLPs, nhưng L2 không cần thiết cho việc hình thành vỏ capsid. L1 và L2 bộc lộ đặc hiệu trong hầu hết lớp ngoài cùng của tế bào sừng (nơi giải phóng các vi rút mới được hình thành).

Mặc dù L2 không đặc biệt cần thiết cho việc hình thành vỏ capsid nhưng có vai trò quan trọng trong chu kỳ sống và trong quá trình xâm nhập của vi rút do L2 có khả năng tạo sự gắn kết giữa receptor bề mặt tế bào với actin và với PML, cần thiết cho giai đoạn đầu của quá trình xâm nhiễm.

1.2. Phân loại HPV

1.2.1. Lịch sử phân loại

Ban đầu, Papillomavirus được xếp cùng nhóm với Polyomavirus thuộc họ Papovaviridae. Tên họ Papovaviridae được đặt theo hai chữ cái đầu của các vi rút đầu tiên được phân loại trong họ vi rút này: rabbit **p**apillomavirus, mouse **p**olyomavirus và simian **v**acuolating virus (SV40) [21].

Đặc điểm chung của các vi rút họ Papovaviridae là có kích thước nhỏ, không vỏ bọc, capsid hai mươi mặt và DNA gồm hai chuỗi tồn tại dạng siêu xoắn hình vòng. Tuy nhiên, khi so sánh về kích thước, Papillomavirus (khoảng 55nm) có kích thước lớn hơn so với Polyomavirus (khoảng 45nm). Dựa trên sự khác biệt về này, họ Papovaviridae chia làm hai nhóm là Polyomavirus (bao gồm các Polyomavirus và SV40) và Papillomavirus [21].

Hơn nữa, những nghiên cứu về sinh học chức năng và sinh học phân tử đã cho thấy sự khác biệt rõ ràng về đặc điểm di truyền cũng như tính chất sinh vật học của hai nhóm vi rút, từ đó cho phép phân loại Papillomavirus một cách hoàn chỉnh và tách hoàn toàn riêng biệt khỏi nhóm Polyomavirus. Như vậy, tất cả Papillomavirus chỉ là một nhóm duy nhất, thuộc họ Papillomaviridae [7], [21], [23].

1.2.2. Phân loại HPV

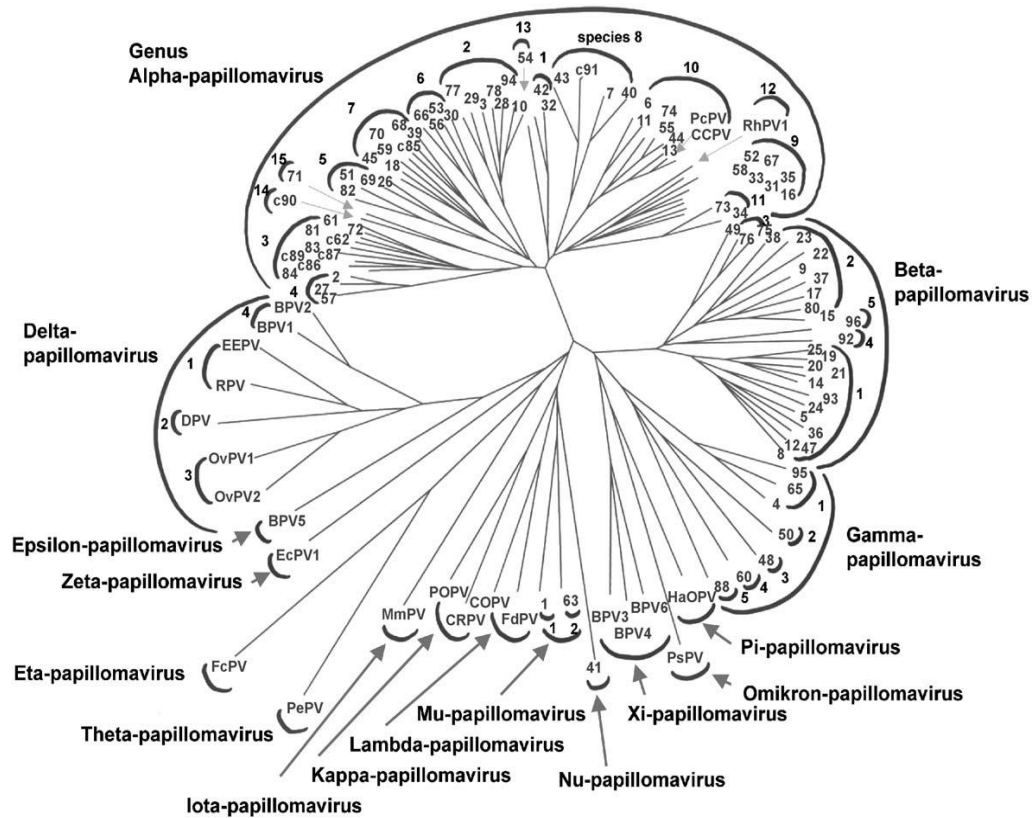
1.2.2.1. Phân loại theo sự tương đồng trình tự nucleotide gen E6, E7, L1

Theo Hội phân loại vi rút học quốc tế (International Committee on the Taxonomy of Viruses), họ Papillomaviridae gồm 15 loại khác nhau (Ký hiệu: Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon-, Zeta-, Theta-, Iota-, Kappa-, Lambda-, Mu-, Nu-, Xi-, Omikron-, Pi-papillomavirus) [24], [25], [26].

HPV là Papillomavirus họ Papillomaviridae gây bệnh trên người và là một trong những vi rút có nhiều genotype nhất. Gần 200 genotype được biết đến, nhưng chỉ xác định được khoảng 100 genotype [3] bao gồm khoảng 40 type có khả năng lây truyền qua đường sinh dục. Mỗi genotype gồm các phân type khác nhau (subtype) và dưới các phân type được chia thành các biến thể (variant) còn gọi là các chủng vi rút [4], [7], [23].

Việc xác định genotype HPV không dựa vào huyết thanh như với các loại vi rút khác (vi rút gây viêm gan, HIV ...) mà dựa trên mức độ giống nhau của thành phần nucleotide và mức độ tương đồng giữa các thành phần acid amin trên chuỗi gen E6, E7 và L1 do đó, các type của HPV thường được gọi là các genotype [24].

Khi một genotype HPV có ít nhất 10% gen vùng E6, E7, L1 khác với các genotype đã biết trước đó thì được xác định là một genotype mới. Một subtype trong genotype được xác định là phân nhóm mới khi bộ gen của chúng khác 2-10% so với phân nhóm khác trong cùng một genotype đã biết. Nếu các subtype có vùng mã hóa khác nhau 1-2% hoặc khác 5% ở vùng không mã hóa thì được gọi là các biến thể [24].



Hình 1.3. Cây phả hệ của 118 genotype Papillomavirus dựa trên trình tự gen vùng L1 ORF. Chuỗi gen được xử lý bằng phần mềm Phylip version 3.572 và phân tích phả hệ bằng Treeview program [24]

Hầu hết HPV gây bệnh trên người và động vật đều thuộc loại Alpha-papillomavirus (thích ứng ở niêm mạc) hoặc thuộc loại Gamma-papillomavirus (thích ứng ở biểu mô sừng) [21].

Mỗi genotype của HPV có một sự thích nghi cao với một loại biểu mô nhất định và khả năng gây bệnh của các genotype không giống nhau trên tế bào đích, phụ thuộc vào cách tác động khác nhau của các vùng gen vi rút đối với protein bao phủ tế bào chủ ở những vị trí khác nhau trên cơ thể [3]. Chính vì vậy, HPV còn có thể phân loại theo khả năng gây bệnh và vị trí gây bệnh.

1.2.2.2. Phân loại theo khả năng tác động của HPV trên tế bào chủ (khả năng gây ung thư)

Theo khả năng gây ung thư, HPV được chia thành 3 nhóm:

(1) Nhóm genotype HPV “nguy cơ thấp” (Low-risk type): những genotype HPV thuộc nhóm này chỉ gây những mụn cóc hoặc khối u lành tính. Bộ gen của chúng tồn tại dạng episome, DNA dạng vòng nằm ngoài nhiễm sắc thể chủ. Các genotype HPV trong nhóm “nguy cơ thấp” thường gặp là: HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89 và CP6108 [3], [7].

(2) Nhóm genotype HPV “nguy cơ cao” (High-risk type): gồm những genotype HPV có khả năng tích hợp DNA vào hệ gen người, làm rối loạn quá trình nhân lên của tế bào chủ, gây ra hiện tượng tăng sinh và bất tử hóa tế bào hình thành các khối u ác tính. Những genotype có khả năng gây ung thư thường gặp gồm HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 và HPV 26, 53, 66 [3], [7].

(3) Nhóm genotype HPV “chưa xác định nguy cơ” (Unknown-risk type): gồm đa số các genotype HPV chưa xác định được khả năng gây ung thư như HPV 2a, 3, 7, 10, 13, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90, 91 [3], [7].

1.2.2.3. Phân loại theo vị trí gây bệnh của HPV (khả năng thích ứng của HPV trên tế bào đích)

Theo vị trí gây bệnh, HPV được chia thành 3 nhóm [3]:

(1) Nhóm HPV thích ứng biểu mô sừng: Những HPV ở nhóm này có khả năng xâm nhiễm trên da, hình thành các dạng hạt cơm thông thường (HPV 2, 4, 26, 27, 29, 57), hạt cơm phẳng (1, 2, 4), hạt cơm Butcher (HPV 7). Tổn thương thường xuất hiện ở da mặt, cổ, tay và chân. Đặc biệt, một số genotype HPV ở nhóm này còn có khả năng gây loạn sản thượng bì dạng hạt cơm Epidermodysplasia verruciformis (HPV 2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 25, 36, 37, 46, 47, 50), một dạng bệnh lý có khả năng dẫn đến ung thư da và thường xuất hiện trên bệnh nhân suy giảm miễn dịch.

(2) Nhóm thích ứng tế bào niêm mạc, không phải là niêm mạc đường sinh dục: Gồm những HPV có khả năng gây bệnh ở niêm mạc miệng và hầu họng (HPV 6, 11, 13, 32), gây đa bướu gai hô hấp tái diễn (Recurrent respiratory papillomatosis). Một số genotype HPV là nguyên nhân gây bệnh

lý lành tính (khối u sùi) hoặc gây bệnh lý ác tính (ung thư) vùng hậu môn, ung thư phổi (HPV 6,11, 16, 18, 33, 52).

(3) Nhóm thích ứng tế bào niêm mạc đường sinh dục: Nhóm HPV gây bệnh tại đường sinh dục như sùi mào gà (HPV 6, 11, 42, 43, 44, 54), UTCTC, ung thư dương vật, ung thư âm hộ, ung thư âm đạo (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82).

1.3. Chu kỳ sống của HPV

Chu kỳ sống của HPV liên quan chặt chẽ với tế bào biểu mô vật chủ, được chia làm 4 giai đoạn:

(1) **Giai đoạn xâm nhập:** Vị trí đầu tiên HPV xâm nhập vào là tế bào lớp đáy ở những vị trí dễ tổn thương thông qua receptor integrin. Ở lớp tế bào này, số lượng vi rút thấp và tồn tại ở dạng episomal tách rời với gen của tế bào vật chủ.

(2) **Giai đoạn tiềm tàng:** DNA HPV có thể tồn tại rất lâu với số lượng ít và không sao chép, không tạo các hạt vi rút. Các gen E1, E2 rất cần thiết cho sự nhân lên của vi rút ở giai đoạn này.

(3) **Giai đoạn nhân bản mạnh:** Cùng với quá trình nhân lên và biệt hóa từ lớp tế bào đáy lên các tế bào ở lớp trên, các tế bào sừng bị nhiễm HPV mới hình thành cũng di chuyển lên các lớp trên, các gen muộn HPV được bộc lộ và khởi động giai đoạn tăng sinh của vi rút, DNA HPV được nhân lên trong tế bào chủ. Chu kỳ nhân lên của vi rút không kèm theo hiện tượng chết hoặc phân hủy tế bào do vậy không gây hiện tượng viêm và sản xuất các cytokine tiền viêm. Các gen E5, E6, E7 tác động hỗ trợ cho hoạt động nhân lên của vi rút đồng thời tăng hoạt động tổng hợp DNA của tế bào chủ và ngăn hiện tượng apoptosis.

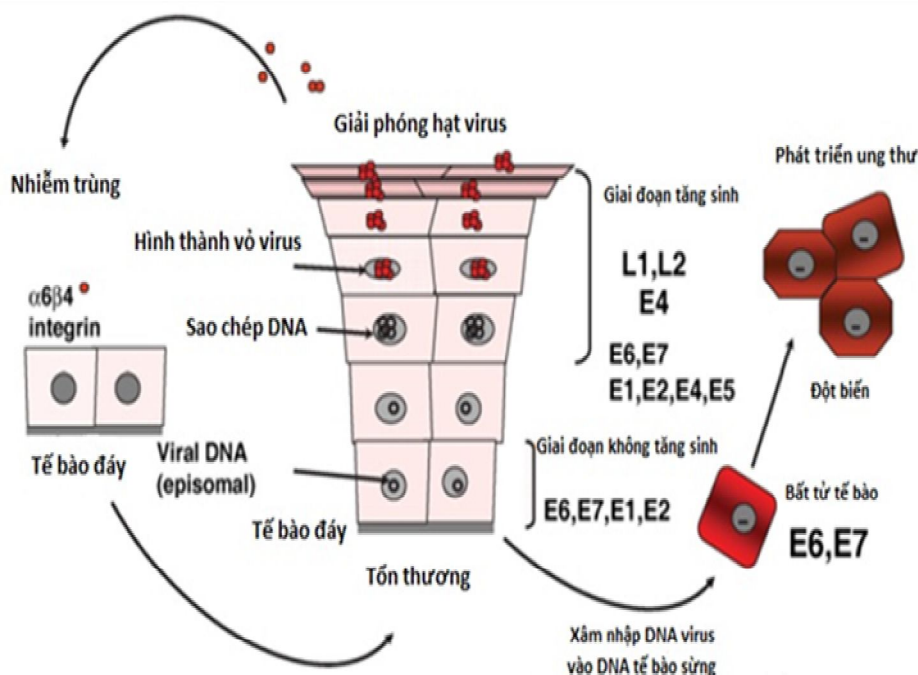
(4) **Giai đoạn giải phóng:** Ở lớp tế bào sừng ngoài cùng, gen L1 và L2 có vai trò hình thành vỏ capsid cho DNA của vi rút. Các hạt vi rút mới được hình thành giải phóng ra bề mặt tế bào sừng.

Quá trình biểu hiện gen và quá trình phát triển nhân lên của vi rút xảy ra trong nhân tế bào chủ, liên quan chặt chẽ với quá trình tăng sinh của tế bào chủ ở lớp tế bào đáy mà không có giai đoạn HPV di chuyển trong máu. Tuy

nhân, HPV DNA vẫn có thể được tìm thấy trong các tế bào bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi, trong các tế bào di căn trên các bệnh nhân ung thư do HPV, các trường hợp đồng nhiễm HIV. Điều này được giải thích do trong quá trình biểu hiện gen và trong quá trình nhân nhân bản mạnh của vi rút đã xảy ra hiện tượng đứt gãy đoạn gen E2 và gen E6 [27].

Có nhiều cơ chế giải thích sự lẩn trốn của HPV khỏi đáp ứng miễn dịch của vật chủ đối, gây nhiễm dai dẳng HPV dẫn đến sự biến đổi tế bào. E6 và E7 của HPV nhóm “nguy cơ cao” làm cơ thể suy giảm khả năng sản xuất interferon, cytokine, ức chế đáp ứng miễn dịch tự nhiên tiêu diệt vi rút và điều hòa miễn dịch. Gen E6 có khả năng gắn vào yếu tố 3 điều hòa interferon (IRF-3) gây ức chế chức năng hoạt hóa của yếu tố này. Đồng thời, gen E7 phản ứng với IRF-1 gây ức chế sự sao chép đối với yếu tố thúc đẩy IFN-1.

Mặc dù, HPV có khả năng lẩn trốn khỏi cơ chế đáp ứng bảo vệ của cơ thể vật chủ nhưng hầu hết các trường hợp nhiễm HPV diễn ra ngắn và tổn thương có thể tự hết trong vòng 1 năm hoặc dưới tác động của đáp ứng của hệ miễn dịch cơ thể. Khoảng 91% HPV bị loại bỏ tự nhiên trong năm đầu sau nhiễm và 70% xảy ra trong năm thứ hai. Tuy nhiên, một tỷ lệ nhỏ HPV có thể tồn tại dai dẳng ở lớp tế bào đáy và là nguyên nhân dẫn đến sự biến đổi tế bào.



Hình 1.4. Chu kỳ sống của HPV [2]

1.4. Cơ chế gây bệnh của HPV

HPV lây truyền chủ yếu qua đường tình dục và có thể lây truyền khi tiếp xúc trực tiếp từ da qua da. HPV có khả năng thích ứng ở biểu mô sừng và niêm mạc gây tăng sinh tế bào biểu mô và gây biến đổi tế bào dẫn đến ung thư qua các bước sau [28], [29].

(1) **Xâm nhập chuỗi gen của HPV vào tế bào chủ:** Bộ gen HPV xâm nhập vào chuỗi gen của vật chủ ở dạng episome (DNA dạng vòng ở ngoài nhiễm sắc thể vật chủ) đối với HPV nhóm “nguy cơ thấp” hoặc tích hợp DNA vào nhiễm sắc thể vật chủ đối với HPV nhóm “nguy cơ cao”.

Ở dạng episome, vùng gen mã hóa E2 không bị biến đổi. Nồng độ protein E2 tăng lên cùng với sự tăng sinh sao chép DNA HPV gây hiện tăng sinh tế bào đồng thời ức chế giải mã gen sớm kìm chế hoạt động của E6 và E7. Khi E6 và E7 bị kìm chế sẽ hoạt hóa con đường p53 và yếu tố ức chế hình thành u pRb giúp tế bào sửa chữa hoặc chết theo chương trình phụ thuộc vào mức độ của sự tác động phá hủy. Do đó, có hiện tăng sinh một số lượng lớn tế bào nhưng vẫn dưới sự kiểm soát của p53 và pRb.

Khi chuỗi gen HPV xâm nhập vào nhiễm sắc thể vật chủ sẽ gây phá vỡ gen E2 và giải phóng sự kìm chế hoạt động của E6 và E7. Hai oncogen E6, E7 có khả năng gắn và làm giảm chức năng của p53 và pRb, đây là điều kiện quan trọng để gây biến đổi gen tế bào chủ [30].

(2) **Gây bất tử hóa tế bào:** Protein E6, E7 của các genotype HPV nhóm “nguy cơ cao” còn có khả năng kết hợp với *ras*. Protein *ras* là phân tử truyền thông tin nội tế bào, khi *ras* được hoạt hóa làm tế bào phát triển, biệt hóa và duy trì sự sống. Gen mã hóa protein *ras* được coi là gen gây ung thư phát hiện đầu tiên. Cơ chế của protein E6 gây bất tử tế bào được chứng minh bằng khả năng bất hoạt p53, bộc lộ hTERT (human telomerase reverse transcriptase) và tăng hoạt động telomerase [30].

(3) **Bất ổn định gen tế bào chủ:** Bất thường quá trình phân bào có thể gây ra bởi protein E6 và E7 của các genotype nhóm “nguy cơ cao” mà không gặp ở genotype nhóm “nguy cơ thấp”, gây mất alen ở một số gen nhất định mà các

gen này liên quan đến sự xuất hiện và tiến triển của ung thư. E6 gây bất ổn định gen do khả năng ức chế chức năng p53 dẫn đến rối loạn quá trình sửa chữa DNA bình thường và hậu quả gây thay đổi gen. E7 gây bất ổn định gen thông qua sự bất hoạt của pRb và gây bất ổn định gen do khả năng tác động lên tổng hợp trung thể và hậu quả gây biến đổi sự chia tách DNA trong quá trình phân chia tế bào [31].

(4) ***Biến đổi đáp ứng với phá hủy DNA***: Gen E6 và E7 có thể gây mất khả năng đáp ứng của cơ thể với sự phá hủy DNA. Khi có sự phá hủy DNA, cơ thể đáp ứng bởi hoạt hóa p53 tạo ra protein điều hòa quá trình nghỉ giữa hai chu trình nhân lên của tế bào. E6 và E7 có khả năng ức chế quá trình nghỉ giữa quá trình phân bào được điều khiển bởi p53. E6 chỉ kết hợp và bất hoạt p53, nhưng E7 không chỉ gây rối loạn chức năng yếu tố điều hòa chu trình tế bào, pRb mà bất hoạt p21, chất ức chế enzym kinase phụ thuộc cycline, yếu tố cần thiết xuất hiện do p53 hoạt hóa [32].

(5) ***Tăng sinh và biệt hóa tế bào***: HPV nhân lên theo quá trình biệt hóa của tế bào đáy dưới dạng episome, đồng thời nhân lên trong các tế bào lớp trên tế bào đáy đã thoát khỏi chu trình nhân lên của tế bào nhờ vai trò tái thiết lập chương trình tiếp tục tổng hợp DNA ở tế bào sừng bị nhiễm của E6, E7 HPV [33].

1.5. Đường lây truyền, các yếu tố nguy cơ gây nhiễm HPV

1.5.1. Đường lây truyền của HPV

HPV có thể được lây truyền trực tiếp qua da và niêm mạc từ người bệnh sang người lành trong đó lây truyền qua đường tình dục chiếm đa số. Hoạt động tình dục đồng giới hoặc khác giới đều là nguyên nhân lây truyền trực tiếp HPV qua đường sinh dục, miệng và hậu môn.

HPV còn có thể được lây truyền từ da qua da, từ da sang niêm mạc hoặc từ niêm mạc sang niêm mạc dưới dạng dịch tiết mụn cơm, qua nước bọt hoặc qua các vật dụng như khăn mặt, quần áo... mang HPV của người bệnh.

Ngoài ra, HPV cũng được lây truyền từ mẹ sang con trong quá trình chu sinh, dịch tiết nhiễm HPV từ đường sinh dục bà mẹ lây truyền trực tiếp vào niêm mạc mắt, miệng và đường hô hấp trẻ sơ sinh và là nguyên nhân các bệnh lý dai dẳng tại đường hô hấp do HPV như đa bướu gai hô hấp tái diễn...

1.5.2. Các yếu tố nguy cơ gây nhiễm HPV

* Hành vi tình dục: HPV được lây truyền chủ yếu qua đường tình dục do đó các yếu tố về hành vi tình dục là yếu tố nguy cơ hàng đầu trong các nghiên cứu về dịch tễ học của HPV. Các hành vi tình dục có nguy cơ nhiễm HPV cao gồm: Tuổi quan hệ tình dục đầu tiên; số lượng bạn tình và hành vi tình dục an toàn.

* Thuốc tránh thai

* Đồng nhiễm các bệnh lây truyền qua đường tình dục.

1.6. Cách phòng nhiễm HPV

Phòng nhiễm HPV là công tác phòng bệnh có ý nghĩa tiên quyết nhằm giảm tỷ lệ nhiễm HPV trong cộng đồng bao gồm:

+ Sử dụng vắc xin phòng chống HPV: Vắc xin HPV là các hạt vi rút có cấu trúc giống HPV nhưng không có DNA HPV mà chỉ có vỏ capsid với các kháng nguyên L1, L2 trên bề mặt (Virus-Like-Particles, VLPs).

Hiện nay, hai loại vắc xin được sử dụng phổ biến trên thế giới là là Gadasil® (đặc hiệu HPV type 6,11,16,18; sử dụng cho nữ 9-26 tuổi và cho nam 11-26 tuổi chưa từng quan hệ tình dục) và Cervarix® (đặc hiệu HPV type 16,18; sử dụng cho nữ từ 10 đến 45 tuổi).

+ Thực hiện hành vi tình dục an toàn: Việc sử dụng bao cao su hoàn toàn trong suốt thời gian quan hệ tình dục cũng là biện pháp giúp phòng tránh các bệnh lây truyền qua đường tình dục và góp phần phòng lây nhiễm HPV.

1.7. Các bệnh lý thường gặp do HPV và các điều trị

1.7.1. Các bệnh lý thường gặp do HPV

(1) Các bệnh lý lành tính:

Mụn cơm

Loạn sản thượng bì dạng hạt cơm (Epidermodysplasia verruciformis)

U nhú thực quản

Đa bướu gai hô hấp tái diễn (Recurrent respiratory papillomatosis)

Sùi mào gà

(2) Bệnh lý ác tính:

Ung thư da không phải u hắc tố (Nonmelanoma skin cancer)

Ung thư cổ tử cung

Ung thư dương vật

Ung thư hậu môn

Ung thư vùng hầu họng

Ung thư phổi

1.7.2. Điều trị

Đa số HPV xâm nhiễm vào tế bào chủ chỉ tồn tại trong thời gian ngắn, khoảng 90% HPV bị đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và đáp ứng miễn dịch (Ig A) trong 12 đến 36 tháng đầu sau nhiễm.

Những tổn thương tại chỗ ở biểu mô trên da và niêm mạc được điều trị bằng phương pháp điều trị lạnh (cryotherapy), bằng phương pháp laser hoặc bằng phương pháp cắt vòng bằng điện (Loop electrosurgical excision procedure).

Ở bệnh nhân ung thư do HPV, phẫu thuật là phương pháp được sử dụng chủ yếu. Xạ trị và hóa trị liệu chỉ được sử dụng trong trường hợp bệnh nhân không thể phẫu thuật được.

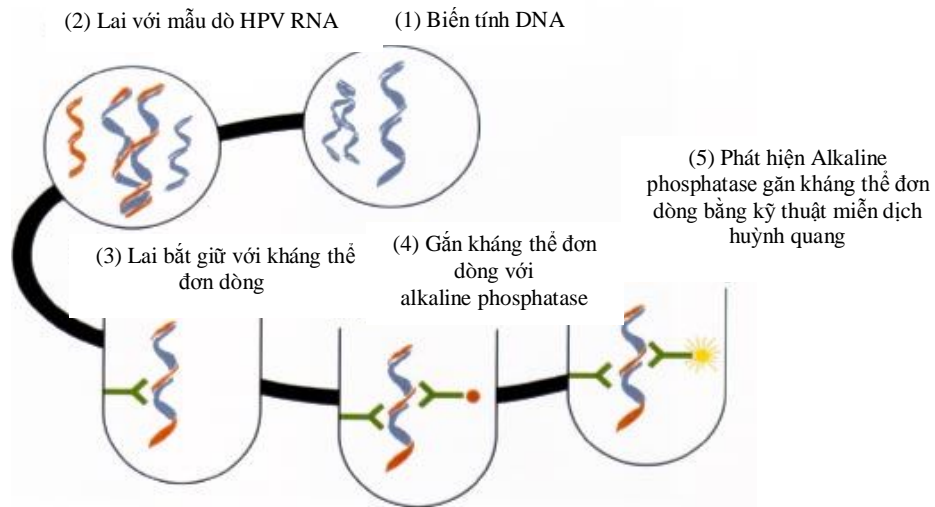
1.8. Các phương pháp phát hiện HPV ở mức độ phân tử và xét nghiệm mô bệnh học

1.8.1. Các phương pháp phát hiện HPV ở mức độ phân tử (Molecular diagnostics)

Do HPV không phát triển trong điều kiện nuôi cấy ở phòng thí nghiệm mà chỉ có thể thực hiện nghiên cứu *in vivo* trên người hay động vật bị nhiễm, các kháng nguyên capsid của vi rút xuất hiện không ổn định và kháng thể kháng protein capsid HPV vẫn tồn tại nhiều năm sau khi đã loại bỏ hoàn toàn HPV nên các xét nghiệm miễn dịch học rất ít được sử dụng trong phát hiện HPV [32].

1.8.1.1. Phương pháp lai phân tử

Phương pháp lai là phương pháp khuếch đại tín hiệu được sử dụng phổ biến để phát hiện HPV trong bệnh phẩm, dựa sự phát quang bằng phản ứng hóa học của phức hợp gồm kháng thể bị bắt giữ -dung dịch lai và tín hiệu được khuếch đại.



Hình 1.5. Phương pháp lai phân tử phát hiện HPV [3]

Các loại phương pháp lai sử dụng trong phát hiện HPV bao gồm:

- Hệ xét nghiệm II bắt giữ thể lai (Hybrid Capture II Test System)

Có nhiều phương pháp lai được ứng dụng phát hiện HPV nhưng kỹ thuật lai bắt giữ (Hybrid Capture technology) là kỹ thuật được ứng dụng phổ biến nhất. Kit ứng dụng kỹ thuật lai bắt giữ để phát hiện HPV thế hệ 2 (second-generation HPV detection kit-HCII) do tập đoàn Diegene công bố và được US FDA công nhận vào năm 1999 là kỹ thuật được sử dụng nhiều hơn trong lâm sàng.

Nguyên tắc kỹ thuật dựa trên hiện tượng lai HPV DNA với đầu dò RNA đặc hiệu. Đầu dò RNA có thể được đánh dấu bằng phóng xạ hoặc không đánh dấu phóng xạ. Phức hợp lai DNA-RNA được phát hiện bởi kháng thể đặc hiệu đã gắn alkaline phosphatase trên máy miễn dịch huỳnh quang. Mỗi phức hợp lai sẽ phát một tín hiệu huỳnh quang (relative light unit - RLU), số lượng tín hiệu huỳnh quang tương ứng lượng DNA đích trong mẫu bệnh phẩm.

Kit HCII sử dụng mỗi DNA đặc hiệu 13 type HPV “nguy cơ cao”: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 68 và 5 type HPV “nguy cơ thấp”: 6, 11, 42, 43, 44. Lai bắt giữ là xét nghiệm có độ nhạy cao và có khả năng phát hiện được 1pg/ μ l của DNA HPV16, tương ứng với 105 đoạn gen sao chép.

- Phương pháp lai Southern-blot

Nguyên tắc lai Southern-blot dựa trên khả năng tiếp nhận DNA của màng lai nitrocellulose. Sự ra đời của phương pháp điện di trên gel đã cho phép phân tách các đoạn DNA được cắt bởi enzym cắt giới hạn dựa trên kích thước của chúng và phương pháp chuyển DNA từ gel sang màng lai nitrocellulose là cơ sở cho sự ra đời của phương pháp lai do E.M Southern mô tả năm 1975.

Lai Southern-blot là phương pháp được ứng dụng sớm nhất trong phát hiện HPV. Đây là phương pháp có độ nhạy rất cao, cho phép phát hiện đoạn DNA đích sử dụng các mẫu dò được đánh dấu bằng phóng xạ (hệ thống phát hiện bằng enzym). Các điều kiện cho quá trình lai có thể được kiểm soát tại các thời điểm khác nhau trong hoặc sau quá trình lai bằng cách thay đổi nhiệt độ và nồng độ muối.

Có nhiều phương pháp đánh dấu mẫu dò oligonucleotid khác nhau được sử dụng nhưng đa số mẫu dò thường đánh dấu ở đầu 5' bằng ^{32}P hoặc bằng các chất không phải là phóng xạ như chất nhuộm huỳnh quang đã được gắn với horseradish peroxidase, với alkaline phosphatase, với digoxigenin. Sau đó, phức hợp mẫu dò đã đánh dấu sẽ được phát hiện bởi các kháng thể đặc hiệu [34].

Lai Southern-blot có thể sử dụng DNA tách từ bệnh phẩm đã bảo quản hoặc bệnh phẩm tươi. Sự xuất hiện của sản phẩm lai được đánh giá như tiêu chuẩn chẩn đoán sự có mặt của HPV trong bệnh phẩm vì kích thước của kích thước của đoạn lai được đánh giá bằng nội kiểm dương đặc hiệu cho mỗi phản ứng. Tuy nhiên, độ đặc hiệu của phương pháp này không cao và cần thực hiện bắt buộc tại các phòng xét nghiệm chuyên sâu.

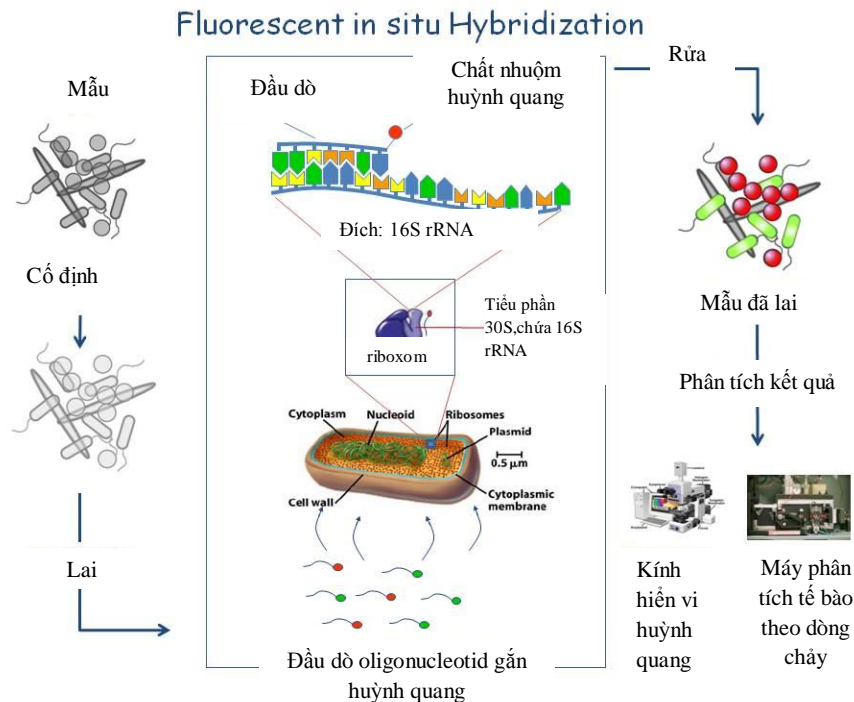
- Dot-blot và Slot-blot

Dot-blot và Slot-blot cũng dựa trên nguyên tắc lai tương tự như phương pháp Southern-blot nhưng thời gian tiến hành nhanh và đơn giản hơn. Sản phẩm PCR sau khuếch đại được chuyển trực tiếp sang màng và lai hóa trực tiếp với đầu dò đặc hiệu. Kỹ thuật này không phải qua giai đoạn điện di trên gel và không qua giai đoạn chuyển màng. Phương pháp này cho phép xác

định 105 – 106 bản DNA sao chép của HPV. Trong quá trình lai ngược, DNA được đánh dấu và được sử dụng như mồi dò để lai trên màng có nhiệt độ cao.

- Phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ (Fluorescence *in situ* hybridization)

Phản ứng lai tại chỗ là phương pháp có khả năng phát hiện, xác định genotype và xác định vị trí của DNA HPV trong tế bào hoặc mô bằng các mồi dò đặc hiệu đã gắn huỳnh quang, do đó có thể sử dụng một mẫu mô cho cả xét nghiệm tế bào học và xét nghiệm lai phát hiện HPV. Mặc dù phương pháp này dễ sử dụng nhưng có độ nhạy và độ đặc hiệu thấp, độ đặc hiệu khoảng 70% cho các mẫu sùi mào gà và khoảng 30% cho các mẫu ung thư nội mạc tử cung (chỉ phát hiện tế bào nhiễm một số lượng lớn vi rút có thể lai chéo với các marker khác trên cùng mẫu mô [32]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào so sánh, đánh giá phương pháp lai tại chỗ và các kỹ thuật khác phát hiện HPV.



Hình 1.6. Phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ phát hiện HPV [26]

Hiện nay, phương pháp lai tại chỗ thường được sử dụng để phát hiện HPV trên mẫu mô là phương pháp khuếch đại tín hiệu không cần phản ứng khuếch đại DNA đích Tyramide (Tyramide Signal Amplification -TSA™). TSA™ có thể khuếch đại đồng thời cả chất nhuộm và tín hiệu huỳnh quang

nên giúp tăng độ nhạy gấp 1000 lần so với phương pháp chỉ sử dụng kháng thể đơn thuần. Khi số lượng vi rút thấp, có thể phối hợp phản ứng PCR khuếch đại DNA đích và phương pháp lai tại chỗ [32].

1.8.1.2. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

Phản ứng khuếch đại chuỗi PCR là phản ứng dây chuyền nhân bản DNA *in vitro* nhờ DNA polymerase nhằm thu nhận một số lượng lớn bản sao của một trình tự xác định, do Kary Mullis phát minh năm 1983. Các môi sử dụng trong phản ứng PCR thường để khuếch đại vùng gen L1 HPV.

Một số kit thương mại phát hiện HPV DNA dựa trên nguyên lý phản ứng PCR:

+ Kỹ thuật Reverse line blot (Roche Molecular systems - Alameda, CA) là kỹ thuật đầu tiên ứng dụng phương pháp PCR trong phát hiện HPV DNA và HPV genotype. Kỹ thuật line blot dựa trên nguyên lý của PCR sử dụng môi PGMY09/11 khuếch đại vùng gen L1 HPV. Sản phẩm PCR được lai với các mẫu dò gồm các mẫu oligonucleotid đặc hiệu đa type HPV gắn trên màng. Phức hợp gắn được phát hiện bằng mắt thường. Reverse line blot có thể phát hiện được 27 HPV genotype khác nhau trong đó có 11 type HPV "nguy cơ thấp". Hiện nay, trên thương mại đã công bố Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) có thể phát hiện 37 HPV genotype bao gồm 14 type HPV "nguy cơ thấp". Đây là loại kit được sử dụng phổ biến nhất trong các phòng thí nghiệm ở Châu Âu, đã được FDA chấp thuận nhưng chưa được phê chuẩn. Ngoài ra, trên thương mại còn có kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics, Ghent, Belgium) với nguyên lý lai Reverse line blot phát hiện 24 HPV genotype khác nhau, L1 DNA HPV được khuếch đại bằng môi SPF 10 và được lai với các đầu dò đặc hiệu trên màng.

+ Amplicor HPV test (Roche Molecular Systems) là kỹ thuật có thể phát hiện 13 type HPV "nguy cơ cao". Nguyên lý kỹ thuật dựa trên phản ứng PCR khuếch đại sản phẩm lai sau khi DNA đích đã lai kháng thể đặc hiệu gắn

huỳnh quang. Nhược điểm của kit là chỉ phát hiện được nhóm genotype HPV mà không phát hiện từng HPV genotype đặc hiệu. So sánh Amplicor với Hybrid Capture II Assay (cùng phát hiện được 13 type HPV "nguy cơ cao") cho thấy độ tương đồng là 83,3% [32].

+ Multiplex HPV Genotyping Kit (Multimetrix, Heidelberg, Germany) là kỹ thuật gắn huỳnh quang sản phẩm PCR và mẫu dò đặc hiệu. Mỗi kit gồm 24 mẫu dò tương ứng 24 genotype HPV, 1 mẫu dò β -globin và 1 mẫu dò chứng. Sau khi sản phẩm PCR được lai với các mẫu dò sẽ được gắn R-phycoerythrin đã đánh dấu streptavidin và được đọc trên máy phân tích Luminex. Đây là Kit có độ nhạy cao và có thể ứng dụng cho các nghiên cứu dịch tễ học, tuy nhiên hiện nay Kit thường chỉ sử dụng cho mục đích nghiên cứu vì giá thành cao.

+ Phương pháp PCR đặc hiệu theo type (type-specific PCR) là phương pháp PCR phát hiện riêng cho từng type HPV khác nhau dựa vào sự khác nhau trên vùng gen E6 và E7. Phát hiện đa nhiễm các type HPV trong cùng một mẫu cũng phải được thực hiện riêng biệt cho từng type. Kit gồm cặp mồi đặc hiệu cho 14 genotype HPV nhóm “nguy cơ cao” dựa trên khả năng khuếch đại 100 bp trên vùng gen E7 HPV. Các genotype HPV có mồi đặc hiệu được phát hiện là HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.

Phương pháp PCR đặc hiệu theo type có độ nhạy rất cao, có thể phát hiện với 0,005 – 0,01ng DNA HPV/ μ l, tiến hành nhanh và xác định được đa nhiễm.

1.8.1.3. Phương pháp real-time PCR

Các phương pháp PCR thông thường chỉ đánh giá định tính mà không đánh giá định lượng vi rút. Real-time PCR là phương pháp khuếch đại đích có độ nhạy cao, thường được sử dụng trong định tính và định lượng DNA HPV.

Real-time PCR cho phép khuếch đại và xác định số lượng bản sao được tạo ra trong từng chu kỳ nhiệt. Kết quả DNA đích được hiển thị ngay sau mỗi chu kỳ nhiệt dựa trên sự tỷ lệ thuận giữa tín hiệu huỳnh quang phát ra và số lượng bản sao DNA được tổng hợp.

Đường chuẩn của phản ứng được xây dựng dựa trên số lượng bản sao DNA đích trong một gam mẫu chuẩn và xác định giá trị chu kỳ ngưỡng cho từng mẫu tương ứng. Chu kỳ ngưỡng (Ct-threshold cycle) là chu kỳ nhiệt mà ở thời điểm đó sản phẩm PCR cho tín hiệu huỳnh quang tăng vọt vượt qua cường độ huỳnh quang nền. Nếu số lượng DNA đích càng lớn thì Ct càng nhỏ và nếu số lượng DNA đích ít thì cần nhiều chu kỳ nhiệt hơn. Phản ứng real-time PCR lý tưởng khi tín hiệu huỳnh quang tăng gấp đôi sau mỗi chu kỳ nhiệt.

Chất phát huỳnh quang chèn vào sợi đôi DNA làm bản sao DNA đích được tạo ra phát huỳnh quang khi có nguồn sáng kích thích. Chất phát quang thường được sử dụng là SYBR Green 1 hoặc các mẫu dò đặc hiệu (Taqman probe, Beacon probe, Hybridization probe...).

Phương pháp real-time PCR có thể thực hiện nhanh, giá thành không đắt, định lượng được sản phẩm DNA và RNA. Phương pháp này có thể phát hiện được 10.000 chuỗi gen sao chép/phản ứng (khoảng 100 tế bào bị nhiễm).

Việc xác định số lượng vi rút cho phép xác định được mRNA, đánh giá sự hoạt động của gen E6 và E7. Khi 2 vùng gen này hoạt động sẽ gây ra những biến đổi cũng như cho các sản phẩm của các vùng gen này. Đây là phương pháp có độ nhạy 100% và độ đặc hiệu 70%.

Trên thương mại có các loại Kit khác nhau dựa trên nguyên lý của real-time PCR như Roche LightCycler 2, Applied Biosystems 7900 HT và Corbett Rotor-Gene 6600. Những kit này thường được sử dụng trong chẩn đoán *in vitro* tại Châu Âu, tuy nhiên vẫn chưa được FDA công nhận.

1.8.1.4. Phương pháp DNA microarray (Phương pháp DNA chip)

Phương pháp DNA microarray là kỹ thuật phát hiện DNA HPV hoặc cRNA HPV bằng cách lai hóa sản phẩm đích với các mẫu dò đặc hiệu đã gắn với các hạt chip silicon trong các giếng trên phiến kính. Sản phẩm lai giữa DNA đích và mẫu dò được phát hiện bằng tín hiệu huỳnh quang hoặc bằng phương pháp hóa phát quang. Cường độ của tín hiệu thu được phụ thuộc vào nồng độ DNA đích.

Mỗi giếng lai có khoảng 10-12 mole trình tự oligonucleotid mẫu dò được thiết kế đặc hiệu với các trình tự bổ xung trên DNA đích hoặc với các

khung đọc mở trên DNA đích. Chiều dài mẫu dò tùy thuộc vào đoạn DNA đích mong muốn.

Phương pháp DNA microarray gồm hai loại:

- Loại DNA microarray hai kênh (two-channel microarray): Thường được sử dụng phát hiện cDNA từ hai mẫu cần so sánh với hai loại mẫu dò được đánh dấu bằng hai loại huỳnh quang khác nhau. Loại huỳnh quang thường được sử dụng là Cy3 (phát xạ huỳnh quang ở bước sóng 570 nm) và Cy5 (phát xạ huỳnh quang ở bước sóng 670 nm). Hai mẫu DNA đích sau khi lai sẽ được trộn chung lại tạo ra một hỗn hợp lai và đọc trên máy scan bằng laser với hai loại bước sóng khác nhau.
- Loại DNA microarray một kênh (one-channel microarray): Phương pháp này chủ yếu sử dụng trong đánh giá kết quả lai của DNA đích với mẫu dò nhưng ít có giá trị trong đánh giá so sánh với các mẫu khác vì việc đánh giá so sánh khả năng lai của cùng DNA đích với mẫu dò phải thực hiện trong điều kiện hoàn toàn giống nhau.

Hiện nay trên thương mại, kit dựa trên DNA array được sử dụng là PapilloCheck (Greiner Bio-One, Monroe, NC) phát hiện 24 HPV genotype. E1 HPV genotype được khuếch đại trong phản ứng PCR sẽ được lai với DNA chip đã gắn cố định các HPV oligoprobe. PapilloCheck có thể tiến hành với 12 mẫu trong cùng thời điểm nên có thể tránh kết quả âm tính hoặc dương tính giả. So sánh với kit Roche Linear array, DNA array cho kết quả xác định genotype HPV tương đồng.

1.8.1.5. Phương pháp giải trình tự gen trên máy tự động

Khác với phương pháp giải trình tự gen bằng phương pháp hóa học và phương pháp enzym, phương pháp giải trình tự gen trên máy tự động dùng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại ddNTP. Nguyên tắc hoạt động của máy là dựa trên sự nhận biết sự phát sáng của vạch điện di trên gel polyacrylamide trong quá trình điện di khi chiếu chùm tia laser đi qua và ghi lại cường độ sáng trên biểu đồ bằng các đỉnh màu khác nhau [35].

Các DNA có thể được xác định trình tự nucleotide trực tiếp hoặc sau khi dòng hóa. Phương pháp giải trình tự gen trực tiếp cho phép tiến hành nhanh và tiết kiệm, tuy nhiên phương pháp này chỉ có thể áp dụng với nguyên liệu giải trình tự là DNA trong sản phẩm PCR có chất lượng tốt, đảm bảo độ tinh sạch vì đôi khi có những vùng gen được nhân lên không đặc hiệu trong phản ứng PCR mà qua điện di không thể xác định được sẽ làm kết quả xác định nucleotide bị rối và khó xác định.

Mục đích của việc dòng hóa nhằm phân tích chính xác vùng DNA cần nghiên cứu và nhân số lượng DNA cần giải trình tự nếu số lượng DNA trong sản phẩm PCR quá ít. Hơn nữa, dòng hóa còn giúp duy trì và bảo tồn sản phẩm PCR đặc biệt là bảo tồn những vùng gen quý.

1.8.2. Xét nghiệm mô bệnh học

Tổn thương hình thái học đặc trưng trên mô bệnh học do HPV là các loại Condilôm (Condilôm phẳng hoặc Condilôm nhọn đỉnh) với hình ảnh tế bào học là các tế bào rỗng Koilocytes (còn được gọi là các tế bào bóng – Baloon cells –) hoặc tổn thương loạn sản sừng Dyskeratosis đặc trưng bởi các tế bào loạn sản sừng Dyskeratocytes và các tế bào lớn Macrocyte [36].

Những bất thường của tế bào biểu mô do HPV bao gồm sự biến đổi tế bào từ giai đoạn mới ASC-US (biến đổi tế bào vảy điển hình ý nghĩa chưa xác định), LSIL (tổn thương nội biểu mô gai độ thấp) tới các tổn thương tiền ung thư HSIL (tổn thương nội biểu mô gai độ cao) và ung thư biểu mô gai tại chỗ hoặc xâm nhập [37].

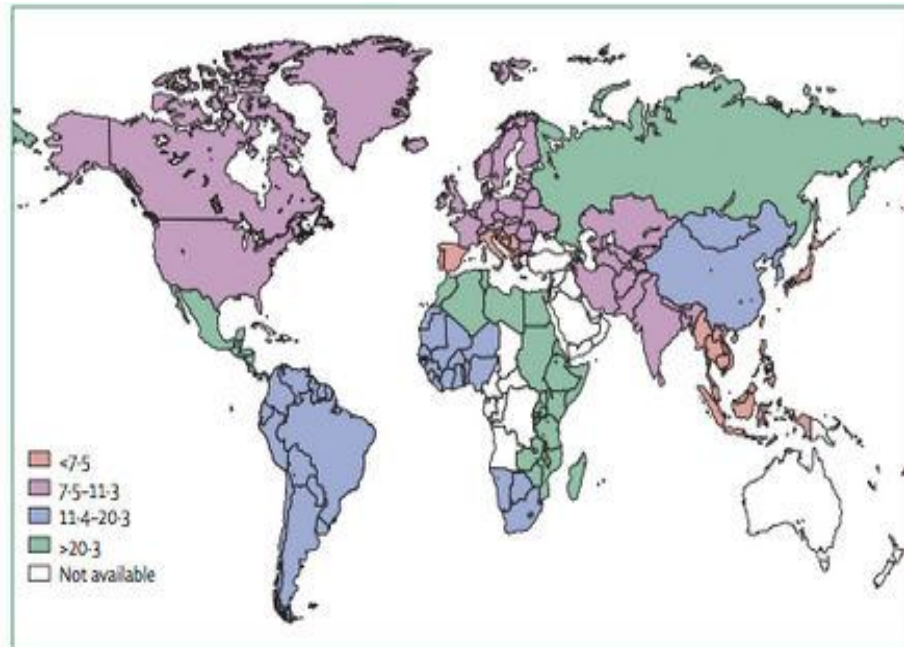
Các xét nghiệm sàng lọc tổn thương và phát hiện bất thường tế bào mô bệnh học có thể áp dụng như test Schiller, bôi lam Toluidine, nghiệm pháp acid acetic qua soi cổ tử cung (VIA: Visual inspection with acetic acid), xét nghiệm Pap smear (xét nghiệm tế bào học theo phương pháp Papnicolaous).

Hình ảnh tế bào học và một số phân loại tế bào học được trình bày cụ thể trong phần phụ lục chương 2 và chương 3.

1.9. Tình hình nhiễm HPV tại Việt Nam và trên thế giới

Theo kết quả báo cáo của Tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế (IARC), trên toàn thế giới có khoảng 6,6% phụ nữ độ tuổi từ 15 đến 74 bị nhiễm HPV

và khoảng 80% phụ nữ nhiễm HPV ít nhất một lần trong suốt đời sống tình dục của họ [8].



Hình 1.7. Sự phân bố tỷ lệ nhiễm HPV ước tính trên thế giới [16]

Theo lứa tuổi, nhóm tuổi dưới 25, tỷ lệ nhiễm HPV ở châu Âu chiếm tỷ lệ cao nhất (50%), tiếp đó đến Trung Á (38%), Châu Úc và Châu Á (21%). Ở nhóm tuổi từ 35 đến 50, tỷ lệ nhiễm HPV có sự thay đổi ở các khu vực, đặc biệt ở khu vực châu Phi và châu Âu. Châu Âu có tỷ lệ nhiễm HPV giảm rõ rệt theo độ tuổi tăng dần của phụ nữ (15%) nhưng ngược lại, Châu Phi lại có tỷ lệ nhiễm HPV tăng cao hơn so với phụ nữ trẻ tuổi dưới 25 (20%) [8].

Theo giới, nam giới được coi là nguồn mang HPV không triệu chứng và là điều kiện làm lây lan HPV trong cộng đồng. Tỷ lệ nhiễm HPV chung ở nam trên toàn thế giới trung bình khoảng 7,9%, dao động từ 3,5 - 45% tùy theo độ tuổi và ở các quốc gia khác nhau, trong đó, tỷ lệ các type “nguy cơ cao” từ 2,3% đến 34,8% và HPV 16 là type thường gặp nhất. Tỷ lệ nhiễm type “nguy cơ thấp” từ 2,3% đến 23,9%. Tình trạng đa nhiễm các type HPV ở nam cũng chiếm tỷ lệ tương đối cao (3,4 - 22,6%). Như vậy, tỷ lệ nhiễm chung ở nam (7,9%) thấp hơn so với ở nữ (17,9%)

Tỷ lệ nhiễm HPV không chỉ thay đổi theo các lứa tuổi mà còn khác nhau giữa các khu vực địa lý. Khi điều chỉnh theo khu vực thì tỷ lệ nhiễm HPV ở

phụ nữ trong cộng đồng trên toàn cầu là 10,41% (95% CI: 10,2 - 10,7%) với khoảng giao động rộng từ 2 đến 44% và tỷ lệ nhiễm chung ở nam giới là 7,9% [8].

Tại Việt Nam, tỷ lệ nhiễm HPV trong cộng đồng dân cư nữ từ 2% đến 10,9% thay đổi theo vùng địa lý, miền Nam Việt Nam có tỷ lệ nhiễm HPV cao hơn miền Bắc Việt Nam. Đến nay, vẫn chưa có công bố nào về tỷ lệ nhiễm HPV ở nam giới [38], [39], [40]

Bảng 1.1. Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm ở một số nước trên thế giới

Quốc gia	Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm
Tp. Hồ Chí Minh, miền nam Việt Nam	85,0% [41]
Tokyo, Nhật Bản	48,4% [42]
Manila, Philippin	57,2% [17]
Thành phố Singapore, Singapore	14,4% [43]
Dhaka, Bangladesh	75,8% [44]
Bali, Indonesia	38,3% [45]
Songkla, Thái Lan	22,9% [46]
PhnomPenh, Campuchia	41,1% [47]
Bengal, Ấn Độ	73,3% [48]
Seoul, Hàn Quốc	47,0% [49]
Quảng Châu, phía Nam Trung Quốc	38,9% [50]
Hồ Châu, phía Nam Trung Quốc	66,7% [51]
Thành phố Mexico, Mexico	48,9% [52]
Mombasa, Kenya	45,5% [53]
Madrid, Tây Ban Nha	39,0% [54]
Lima, Peru	50,6% [55]
Ghent, Bỉ	77,4% [56]

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu gồm 479 gái mại dâm tuổi từ 16 đến 52, được tập trung quản lý tại Trung tâm phục hồi nhân phẩm Thanh Xuân - Hải Phòng, thành phố Cảng lớn nhất phía Bắc, Việt Nam.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Lựa chọn ngẫu nhiên các đối tượng mới được tập trung, chưa tham gia điều trị các bệnh lây truyền qua đường tình dục và cam kết đồng thuận tình nguyện tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: Loại khỏi nghiên cứu những trường hợp gái mại dâm không tình nguyện tham gia nghiên cứu, đã được điều trị các bệnh lây truyền qua đường tình dục hoặc đối tượng nghiên cứu không tham gia lấy mẫu theo đúng quy trình.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Tiến hành nghiên cứu mô tả cắt ngang nhằm xác định các tỷ lệ nhiễm và sự phân bố genotype HPV từ mẫu bệnh phẩm cổ tử cung kết hợp theo thiết kế nghiên cứu thuận tập hồi cứu để xác định các yếu tố nguy cơ. Thiết kế này cũng cho phép phân tích sự liên quan giữa tình trạng nhiễm HPV và sự tổn thương tế bào học cổ tử cung.

Cỡ mẫu trong nghiên cứu được áp dụng theo công thức của Leslie Kish [57], [58]:

$$n = (Z_{1-\alpha})^2 \cdot [p \cdot (1-p)/D^2]$$

Trong đó:

N : Cỡ mẫu

1- α : Độ tin cậy 95%

$Z_{1-\alpha}$: $Z_{0,95} = 1,96$

P : Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm đã được nghiên cứu và công bố.

D : Khoảng sai lệch của kết quả nghiên cứu so với quần thể nghiên cứu chung. Có giá trị từ 3% - 5% (0,03 - 0,05).

Theo công thức tính nêu trên với khoảng sai lệch của kết quả nghiên cứu so với quần thể nghiên cứu chung là 5% và tỷ lệ nhiễm HPV trung bình

trong các quần thể đã được nghiên cứu là 51,3%, cỡ mẫu cần thực hiện trong nghiên cứu này là 384.

2.2.2. Thu thập mẫu nghiên cứu

Những đối tượng đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn, tình nguyện ký cam kết tham gia nghiên cứu được lập danh sách mã hóa. Thông tin cá nhân trên phiếu phỏng vấn, kết quả khám và kết quả xét nghiệm của người tham gia được bảo mật. Tiến hành thu thập mẫu từ tháng 10 năm 2009 đến tháng 10 năm 2012.

Nội dung tiến hành thu thập mẫu nghiên cứu gồm:

* **Thu thập thông tin từ phiếu phỏng vấn đã soạn sẵn:** Các đối tượng tham gia trả lời phiếu phỏng vấn nhằm cung cấp các thông tin: tuổi, tình trạng hôn nhân, trình độ học vấn, hành vi tình dục, tiền sử sản phụ khoa, tiền sử hút thuốc lá, tiền sử về các bệnh lây truyền qua đường tình dục.

* **Khám sản phụ khoa và lấy bệnh phẩm cổ tử cung:**

+ Phát hiện tình trạng bệnh lý đường sinh dục trên lâm sàng: tình trạng viêm, tổn thương và phát hiện các khối u sùi.

+ Lấy bệnh phẩm cổ tử cung cho xét nghiệm tế bào học Pap smear và xét nghiệm phát hiện HPV, *Clamidia trachomatis*, *Nesseria gonorrhoeae*:

Mẫu bệnh phẩm cổ tử cung được lấy tại vùng tổn thương hoặc nghi ngờ tổn thương (vùng cổ ngoài, cổ trong và vùng chuyển tiếp cổ tử cung) ở nửa sau của chu kỳ kinh nguyệt, không lấy mẫu khi đang có kinh nguyệt để tránh mẫu bị lẫn máu. Bệnh nhân không được thụt rửa âm đạo, không được đặt thuốc trong vòng 48 giờ trước khi lấy mẫu.

Dùng bàn chải tế bào cổ tử cung (Honest Uterine Cervical Brushes Type S, Honest Medical, Tokyo, Japan) quay tròn một vòng hết bề mặt cổ tử cung. Nhanh chóng phết mỏng tế bào cổ tử cung lên lam kính và nhỏ dung dịch cồn Fixation (Rapid Fix, Muto, Tokyo, Japan) để cố định tế bào, ghi rõ mã số bệnh nhân bằng bút chì loại dùng cho lam kính xét nghiệm tế bào học.

Sau đó, nhúng chổi tế bào vào ống nghiệm Cryotube loại 2ml đã có 1ml đệm tiêu hủy tế bào (TBE buffer, 50mM Tris-HCl, 5mMEDTA, 2%SDS), quay tròn chổi trong dung dịch 2-3 vòng và rũ nhẹ chổi xuống đáy ống. Bảo quản ngay dịch chứa bệnh phẩm cô tử cung ở -80°C .

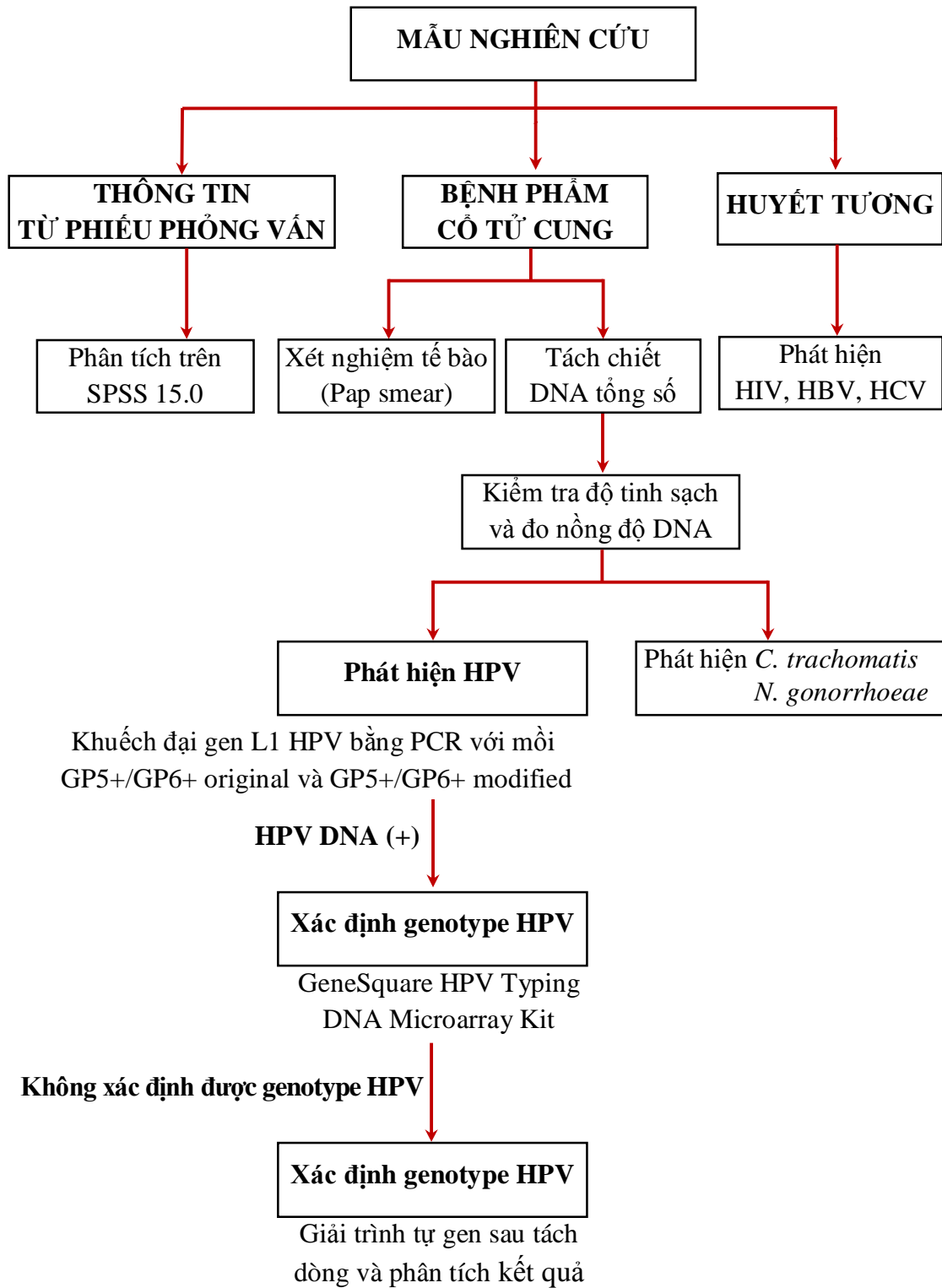
*** Lấy máu tĩnh mạch:**

Lấy 7ml máu tĩnh mạch của mỗi đối tượng nghiên cứu, cho vào ống nghiệm chống đông bằng EDTA K2 DNAase/RNAase Free. Ly tâm, tách huyết tương, bảo quản ngay ở -80°C sử dụng để phát hiện HIV, HCV, HBV.

2.3. Quy trình kỹ thuật phân tích mẫu nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu sau thu thập được tiến hành phân tích tại Khoa virus học và Khoa Giải phẫu bệnh, trường Đại học Kanazawa- Nhật Bản.

2.3.1. Sơ đồ quy trình phân tích mẫu nghiên cứu



2.3.2. Quy trình kỹ thuật phát hiện HPV DNA và xác định genotype HPV

2.3.2.1. Hóa chất, sinh phẩm

- ✓ Hóa chất và sinh phẩm phát hiện HPV DNA

*** Hóa chất và sinh phẩm tách chiết DNA tổng số từ bệnh phẩm cổ tử cung:** Sử dụng bộ sinh phẩm SMITEST DNA extraction kit (Genome Science Laboratories, Fukushima, Japan) gồm:

+ Dung dịch đệm phân hủy hồng cầu (Red cell lysing buffer): Triton X-100, Ion Mg^{2+} .

+ Dung dịch phân hủy protein: Proteinase K, Guanidine, HCl.

+ Dung dịch 2-propanol.

+ Ethanol 100%, Ethanol 70%.

*** Hóa chất và sinh phẩm dùng cho phản ứng PCR khuếch đại HPV DNA**

+10X Buffer, 2mM dNTP, 25mM $MgCl_2$, 5M AmpliTaq Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA).

+ Mỗi GP5+/GP6+ original hoặc mỗi GP5+/GP6+ modifile .

Bảng 2.2. Trình tự nucleotide của các môi GP5+/GP6+

Loại môi	Tên môi	Base	Trình tự môi	%GC	TM (Nhiệt độ bắt cặp)
GP5+/GP6+ original	GP5+	23	tttgttactgtgtagatactac	46.1	51.9
	GP6+	25	gaaaataaactgtaaactcatattc	42.4	53.9
GP5+/GP6+ modified	GP5+M1	23	tttRttactgttgWgatactac	43.4	42.5
	GP5+M2	21	tgtWactgttgWgataccac	44.7	46.2
	GP5+M3	20	gtWactgttgRgacaccac	46.9	45.9
	GP6+M1	29	aattgaaaWataaactgtaaWtcatattc	45.0	55.0
	GP6+M2	25	gaaacataaaYtgtaaatacaWattc	43.2	51.3
	GP6+M3	21	gaaaatYtgcaaatcaWactc	41.7	50.6

(R: Pyrimidine C hoặc T; W: A hoặc T; Y: Purine A hoặc G)

*** Dung dịch đệm di phát hiện HPV DNA**

+ Dung dịch đệm điện di TBE 0,5X: Pha loãng từ dung dịch gốc TBE 5X có thành phần như sau:

Tris base	27 g
Axit Boric	13,8 g
0,5M EDTA pH 8,0	10 ml

Nước khử ion vừa đủ 500 ml

Khuấy đều trên máy khuấy từ trong vòng 1 giờ.

+ Gel agarose 2%: Cân 2 gam agarose, bổ xung 100 ml đệm TBE 0,5X.

Đun tan trong lò vi sóng khoảng 2-3 phút. Để nhiệt độ hạ xuống dần khoảng đến 50°C rồi đổ ra khay điện di đã có lược tạo giếng tra mẫu.

+ Ethidium bromide (EtBr) dung dịch mẹ (10mg/ml): Hòa tan 1gam EtBr trong 100 ml nước. Khuấy vài giờ bằng máy khuấy từ cho tan đều. Giữ lọ màu ở nhiệt độ phòng. Khi dùng pha 20 µl dung dịch mẹ trong 100 ml đệm TBE 0,5X.

+ Đệm tra mẫu DNA (Loading buffer) 5X:

Tris-HCl 1M, pH 8,0 1ml

EDTA 0,5M, pH 8,0 0,2 ml

Glycerol 2 ml

Bromphenol Blue 1% 2 ml

✓ Hóa chất và sinh phẩm xác định genotype HPV

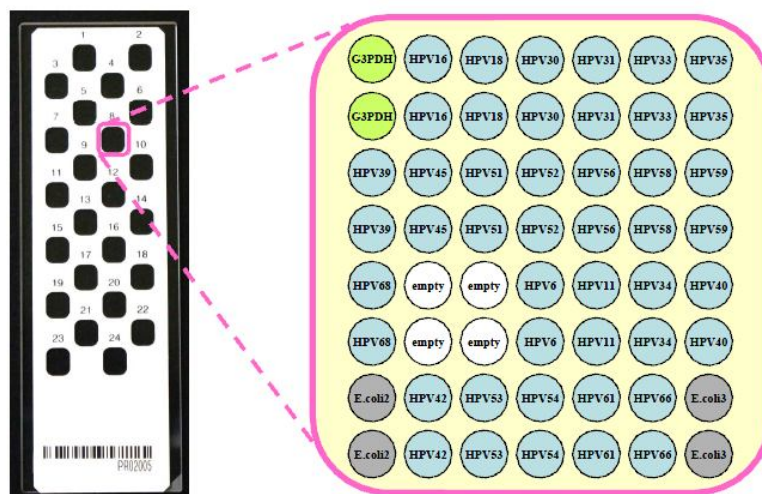
* **Xác định genotype HPV bằng phương pháp DNA Microarray:** Sử dụng bộ sinh phẩm GeneSQUARE HPV genotyping Kit (Kurabo, Osaka, Japan).

Kỹ thuật xác định genotype HPV : Multiplex PCR và Microarray

Số lượng mẫu/phiên : 24 mẫu xét nghiệm/slide

Kích thước mẫu dò : 70 oligo DNA

Số lượng genotype HPV có thể xác định : 23 genotype



Hình 2.1. Kit xác định genotype HPV bằng kỹ thuật DNA microarray

- Các gene gắn trong giếng gồm:

HPV genotype : HPV 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, (23 gene)
42, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 66, 68.

Gene nội kiểm : G3PDH (1 gene)

Gene ngoại kiểm : Gene có nguồn gốc từ Ecoli (2 gene)

- Dung dịch đánh dấu huỳnh quang: Cy3 fluorescence.

- Dung dịch lai: NaCl 5%, Tris-sodium citrate 2%.

- Dung dịch Blocking

- Enzym gắn: Streptavidin-Alkaline Phosphatase.

- Dung dịch rửa: Tris-HCl buffer (NaCl 9%, Detegent 2%, Sodium azide 0,05%), Tris-sodium citrate 5%, Sodium Dodecyl Sulphate 0,5% (SDS 0,5%).

* Xác định genotype HPV bằng phương pháp giải trình tự gen sau tách dòng

+ Hóa chất và sinh phẩm tạo dòng gen HPV:

- **Chuyển nạp và biến nạp:** Sử dụng bộ sinh phẩm TOPO TA cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) gồm: Dung dịch muối, TOPO vector (vector tách dòng *pCR*[®] 2.1 đã mở vòng có đầu dính là Thimin), dung dịch SOC, X-gal 20mg/ml.

- **Nuôi cấy vi khuẩn trên thạch Luria-Bertani:**

Cao nấm men 10g

Trypton 10g

NaCl 10g

pH 7,4 (chỉnh bằng NaOH 5N)

Agarose 2%

- **Tách và tinh sạch DNA plasmid:** Sử dụng bộ sinh phẩm GenElute[™] Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Dung dịch Resuspension Solution:

Tris HCl, pH 8 25 mM

EDTA, pH 8 10 mM

Glucose 50 mM

Dung dịch Lysis buffer

NaOH	0,2 M
SDS 0,5%	1 %

Dung dịch Neutralization-Binding buffer

- Đệm axetat natri 3M, pH 5,5
- Dung dịch Cloroform : isoamylalcol (24:1)
- Dung dịch TE (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA)

Dung dịch rửa

- NaOAc 3M, pH 5,2
- Ethanol 100%

+ **Giải trình tự gen:** Sử dụng bộ sinh phẩm BigDye^R Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) gồm BigDye; Mồi xuôi và ngược; Nước cất tinh sạch đã khử ion; 125mM EDTA; 3M NaOAc; 99% Ethanol; 70% Ethanol; HiDi formamide.

2.3.2.2. Trang thiết bị

- Tủ cấy vô trùng (Sanyo, Nhật Bản).
- Máy ly tâm lạnh (Tomy MX 301, Kubota, Nhật Bản).
- Máy ủ và bình cách thủy nhiệt (Kubota, Nhật Bản).
- Lò vi sóng (Sanyo, Nhật Bản).
- Máy lắc ổn nhiệt 37°C, máy khuấy từ, máy khuấy trộn vortex (RotoLab, OSI).
- Tủ lạnh sâu – 30°C, – 80°C (Sanyo, Nhật Bản).
- Máy quang phổ kế Nano Drop (Thermo Scientific, Mỹ).
- Máy soi chụp ảnh gel (Sony, Nhật Bản).
- Cân phân tích 10⁻⁴g, cân điện tử 10⁻²g (Mettler Toledo).
- Bộ nguồn điện di (Bio - Rad), bộ điện di ADN (Advance Tech, Nhật Bản).
- Pipettman, đầu côn các loại (Gilson, Mỹ).
- Nồi khử trùng Tomy MX 500 (Kubota, Nhật Bản).
- Máy PCR Biometra (Siemen, Nhật Bản)

- Máy GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Mỹ)
- Máy Microarray scanner GenePix4000B (Molecular Devices, Mỹ).
- Máy xác định trình tự DNA tự động (ABI 3100, Biosystem, Mỹ).

2.3.2.3. Quy trình chi tiết phát hiện HPV DNA và xác định genotype HPV

2.3.2.3.1. Quy trình kỹ thuật phát hiện HPV

*** Tách chiết DNA tổng số từ bệnh phẩm cổ tử cung**

Quy trình được thực hiện trong buồng hút vô trùng, tránh tạp nhiễm.

- Ủ dung dịch Protein Dissolvent (solution II) ở 50-60°C đến khi tan hết tủa.
- Cho 100 µl dịch bệnh phẩm cổ tử cung vào ống Eppendorf 1,5 ml, sau đó bổ xung 495 µl Protein Dissolvent (solution II) và 5 µl precipitator I. Trộn đều.
- Ủ ở 50°C trong 30 phút. Lắc nhẹ trong thời gian ủ.
- Giảm dần về nhiệt độ phòng.
- Cho 500 µl dung dịch 2-propanol, trộn đều.
- Cắm trên đá 15 phút.
- Ly tâm 12,000 vòng/ phút trong 10 phút ở 4°C.
- Hút hết dịch nổi.
- Cho 500 µl dung dịch Ethanol 70%, trộn đều.
- Ly tâm 12,000 vòng/ phút trong 3 phút ở 4°C.
- Hút hết dịch nổi.
- Cho 500 µl dung dịch Ethanol 70%, trộn đều.
- Ly tâm 12,000 vòng/ phút trong 3 phút ở 4°C
- Hút hết dịch nổi.
- Làm khô trong buồng hút chân không trong 5-10 phút/
- Cho 30 µl of nước tinh khiết vô trùng, để trong 2 phút.
- Dừng ngay hoặc bảo quản ở -30°C.

*** Kiểm tra độ tinh sạch và định lượng DNA bằng phương pháp đo quang phổ**

+ Phương pháp đo quang phổ kế cho phép xác định một cách tương đối nồng độ DNA có trong mẫu nghiên cứu, đồng thời kiểm tra được độ tinh sạch của mẫu đã tách chiết.

+ Nguyên tắc: Phương pháp này dựa vào sự hấp thụ mạnh ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260 nm của các bazơ purin và pyrimidin. Từ giá trị mật độ quang học (OD - Optical Density) ở bước sóng 260 nm của mẫu đo cho phép xác định nồng độ axit nucleic trong mẫu.

+ Một đơn vị OD tương ứng với nồng độ là 50 µg/ml cho dung dịch DNA sợi đôi hoặc 40 µg/ml cho dung dịch RNA hay DNA sợi đơn theo công thức tính như sau trong đó C là nồng độ và d là độ pha loãng mẫu:

- Với dung dịch DNA sợi đôi: $C_{DNA} = OD_{260} \times 50 \times d$

- Với dung dịch RNA hay DNA sợi đơn: $C_{DNA/RNA} = OD_{260} \times 40 \times d$

Cách tính trên chỉ chính xác khi dung dịch axit nucleic sau tách chiết được tinh sạch vì giá trị thật của nồng độ axit nucleic có thể bị sai lệch bởi các protein (cấu trúc từ acid amin thơm hoặc dị vòng: tyrosin, tryptophan, 1 số phenylalanin) trong sản phẩm tách chiết không tinh sạch cũng có khả năng hấp thụ ở bước sóng 260 nm. Tuy nhiên, các protein này lại hấp thụ cao nhất ở bước sóng 280 nm, do đó ta đo thêm ở bước sóng 280 nm để kiểm tra độ sạch của dung dịch.

Để đánh giá mức độ sạch của dung dịch tách, người ta tính tỉ số $OD_{260}/OD_{280} = T$.

Nếu $1,7 < T < 2,0$ thì dung dịch axit nucleic đó được coi là tinh sạch.

+ Cách tiến hành đo mật độ quang của DNA trong sản phẩm tách chiết bằng máy NanoDrop (Hitachi, Nhật Bản):

- Nhỏ 1µl nước cất tinh khiết vô trùng (đã sử dụng trong quá trình pha loãng DNA khi tách chiết) vào buồng đọc để xác định kết quả ống trắng.
- Trộn đều nhẹ nhàng sản phẩm tách chiết, ly tâm nhẹ. Nhỏ 1µl sản phẩm vào buồng đọc.

- Máy tự động đánh giá nồng độ DNA và độ tinh sạch của sản phẩm trên đồ thị.

*** Phản ứng PCR khuếch đại 140 bp vùng gen L1 HPV sử dụng môi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified**

+ Sử dụng môi GP5+/GP6+ original cho phản ứng PCR:

Thành phần phản ứng:

Thành phần	Thể tích (µl)
H ₂ O	26,25
10x Buffer	5
2mM dNTP	5
25mM MgCl ₂	7
20mM GP5+	0,625
20mM GP6+	0,625
Ampli Taq Gold	0,5
Sản phẩm DNA tách chiết	5
Tổng thể tích	50 µl

Chu trình nhiệt:

94°C	10 phút	} 45 chu kỳ
94°C	45 giây	
48°C	4 giây	
38°C	30 giây	
42°C	5 giây	
66°C	5 giây	
71°C	90 giây	
72°C	10 phút	
4°C	vô cùng	

+ Sử dụng môi GP5+/GP6+ modified cho phản ứng PCR:

Thành phần:

Thành phần	Thể tích (μl)
H ₂ O	24,5
10x Buffer	5
2mM dNTP	5
25mM MgCl ₂	7
20mM GP5+ M1-2	0,5
20mM GP5+ M2-2	0,5
20mM GP5+ M3-2	0,5
20mM GP6+ M1-2	0,5
20mM GP6+ M2-2	0,5
20mM GP6+ M3	0,5
Ampli Taq Gold	0,5
Sản phẩm DNA tách chiết	5
Tổng thể tích	50 μl

Chu trình nhiệt:

95°C	10 phút	} 45 chu kỳ
95°C	30 giây	
45°C	30 giây	
74°C	30 giây	
74°C	10 phút	
4°C	vô cùng	

+ Kiểm tra HPV DNA trong sản phẩm phản ứng PCR bằng điện di trên gel agarose:

- Chuẩn bị gel agarose 2%: cho 2g agarose vào 100 ml dung dịch đệm TBE 0,5X. Đun trong lò vi sóng cho agarose tan hoàn toàn. Để nguội xuống

khoảng 50°C rồi đổ dung dịch agarose vào khay điện di đã cài sẵn lược. Sau khoảng 1h, khi gel đã đông, gỡ lược và đặt bản gel vào bể điện di. Đổ đệm TBE 0,5X vào bể để dung dịch ngập cách mặt gel từ 1-2 mm.

-Tra mẫu DNA: Lấy 10 µl sản phẩm PCR pha trong 2 µl đệm tra mẫu 5X và tra vào các giếng nhỏ trong gel. Tra 6 µl DNA marker thang 100 bp vào 1 giếng trên gel để làm chỉ thị phân tử.

- Chạy điện di ở hiệu điện thế 100 V, trong khoảng 30-40 phút. DNA di chuyển từ cực âm đến cực dương. Quan sát sự di chuyển của màu BromophenolBlue để biết khi nào cần dừng điện di.

- Nhuộm DNA bằng EtBr: Nhẹ nhàng lấy bản gel ra khỏi khuôn và ngâm vào dung dịch EtBr nồng độ 2 µg/ml trong thời gian khoảng 10 phút trên máy lắc nhẹ. Sau đó lấy bản gel ra tráng nước rồi quan sát và chụp ảnh dưới ánh sáng tia tử ngoại.

2.3.2.3.2. Quy trình kỹ thuật xác định genotype HPV

Lựa chọn sản phẩm DNA tách chiết từ những mẫu có HPV DNA dương tính (phát hiện bằng phản ứng PCR với các cặp mồi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified) để xác định genotype HPV bằng kỹ thuật DNA microarray hoặc bằng phương pháp giải trình tự sau dòng hóa nếu xác định genotype HPV bằng kỹ thuật DNA microarray không thành công.

✓ **Xác định genotype HPV bằng GeneSquare HPV Typing DNA Microarray Kit**

Bước 1: Khuếch đại HPV DNA bằng phản ứng multiplex PCR

Thành phần phản ứng:

Thành phần	Thể tích (µl)
H ₂ O	9,4
10x Buffer	2,5
2mM dNTP	2,5
25mM MgCl ₂	3,0
Môi xuôi	0,25
Môi ngược	0,25
DNA Taq polymerase	0,1
Sản phẩm DNA tách chiết	2
Tổng thể tích	20 µl

Chu trình nhiệt:

95°C	4 phút	} 30 chu kỳ
95°C	30 giây	
60°C	30 giây	
72°C	60 giây	
72°C	7 phút	
4°C	vô cùng	

Các trình tự tổng hợp bổ xung tách ra, gắn với streptavidin, được đánh dấu bằng Cy3 -dUTP huỳnh quang 10µM.

Trong mỗi phản ứng, có chạy kèm mẫu nội kiểm dương (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) và nội kiểm âm để kiểm tra chất lượng multiplex PCR.

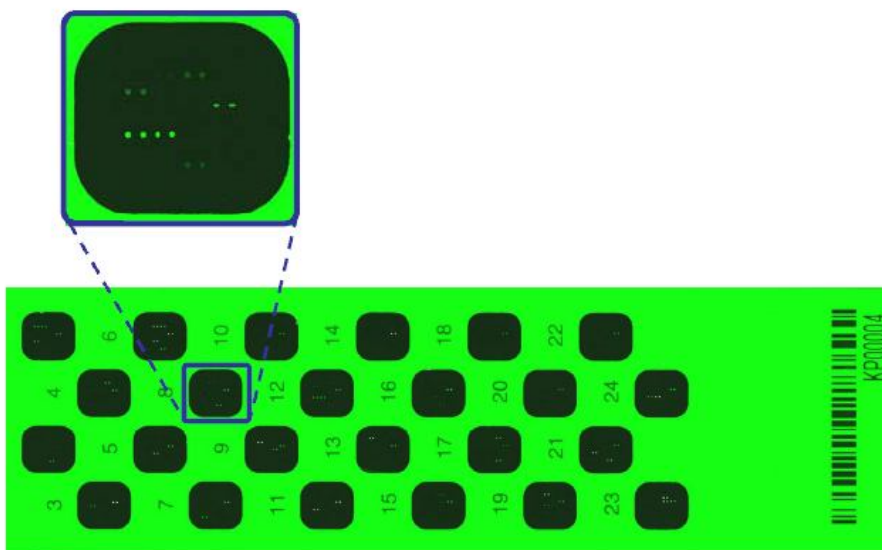
Bước 2: Lai DNA chuỗi đơn

- Gây biến tính 20 µl sản phẩm PCR ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút rồi cắm nhanh trên đá.

- Trộn 10 μl dung dịch lai và 6,2 μl rồi nhỏ vào từng giếng và ủ trong 2 giờ trên máy ở nhiệt độ 45 °C nhằm mục đích lai chuỗi DNA trong sản phẩm PCR đã đánh dấu huỳnh quang với trình tự bổ xung đã gắn sẵn trên giếng thứ 1.
- Hút 8,0 μl sản phẩm lai sang giếng thứ 2, ủ trong 30 phút.
- Nhỏ 500 μl dung dịch block.
- Hút hết dịch và nhỏ 3 lần, mỗi lần 500 μl dung dịch rửa.
- Bịt kín phiên kính có các giếng lai và thả chìm trong bình cách thủy trong 1 giờ ở nhiệt độ 65 °C.

Bước 3: Đọc kết quả

Làm khô tự nhiên và đọc kết quả trên máy microarray scan GenePix4000B (Molecular Devices, Mỹ) ở bước sóng 532nm, cường độ laser 100%, vị trí Focus 30 μm và kích thước điểm ảnh 10 μm .



Hình 2.2. Genotype HPV phát hiện bằng kỹ thuật DNA microarray trên máy scan

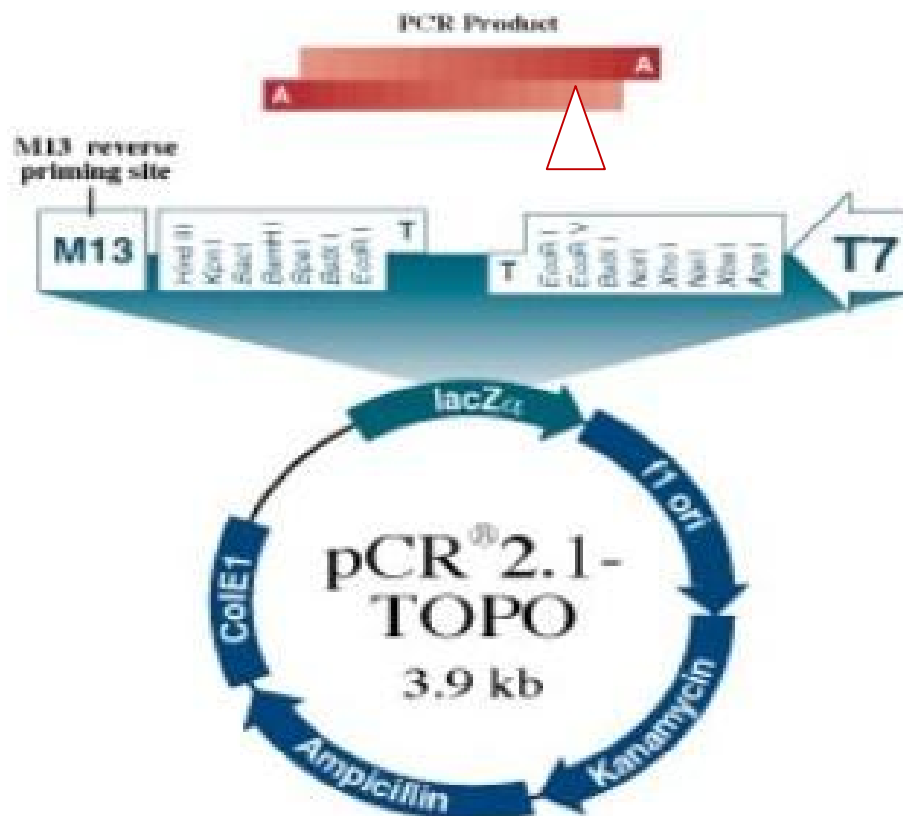
- ✓ **Xác định genotype HPV bằng phương pháp giải trình tự gen sau dòng hóa**

Bước 1: Ghép nối gen và biến nạp DNA plasmid vào *E.coli* chủng InVaF'

+ Ghép nối gen được thực hiện bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm PCR (mồi GP5+/GP6+) vào vector tách dòng *pCR*[®]2.1 với các thành phần phản ứng (TOPO vector mix) như sau:

Dung dịch muối	:	0,5 μ l
TOPO vector	:	0,5 μ l
Sản phẩm PCR	:	2,0 μ l
<hr/>		
Tổng thể tích	:	3,0 μ l

- Để sản phẩm ghép ở nhiệt độ phòng 23 phút.
- Cho 2,0 μ l TOPO vector mix (DNA plasmid mix) vào *E.coli* chủng InV α F', trộn nhẹ nhàng.
- Cắm trên đá 17 phút.
- Sốc nhiệt 42 °C trong 30 giây rồi cắm nhanh trên đá 7 phút.
- Cho 250 μ l dung dịch nuôi dưỡng S.O.C.
- Ủ 1 giờ trong máy lắc nhiệt 37 °C với 200 vòng/phút.
- Giàn đều dung dịch đã chuyển nạp trên thạch LB đã bổ xung ampicillin và phủ đều X-gal (20mg/ml) trên bề mặt.
- Ủ mẫu ở 37 °C trong 16 giờ.



Hình 2.3. Vector tách dòng pCR[®] 2.1

Bước 2: Kiểm tra kết quả ghép nối gen bằng phản ứng PCR với cặp môi khuếch đại vùng gen lacZ_α của vector tách dòng pCR[®] 2.1.

Thành phần của phản ứng:

Thành phần	Thể tích (μl)
H ₂ O	13,1
10x Buffer	2,0
2mM dNTP	2,0
25mM MgCl ₂	2,0
10M M13 xuôi	0,4
10M M13 ngược	0,4
5U Ampli Taq	0,1
Sản phẩm ghép gen	Chấm trực tiếp trên khuẩn lạc trắng bằng tăm vô trùng
Tổng thể tích	20 μl

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau:

95°C	10phút
95°C	30 giây
55°C	30 giây

} 35 chu kỳ

72°C	60 giây
72°C	10 phút
4°C	vô cùng

Điện di trên gel agarose 2%, những mẫu có băng kích thước khoảng 160 bp trên thạch là những mẫu ghép gen thành công.

Bước 3: Nuôi *E.coli* mang DNA plasmid

Nhân số lượng DNA plasmid bằng cách chọn những dòng *E.coli* đã mang DNA plasmid nuôi cấy trong 1,5 ml thạch LB lỏng, ủ 24 giờ trong máy lắc nhiệt 37 °C với 200 vòng/phút.

Bước 4: Tách chiết và tinh sạch DNA plasmid

Chuyển thạch nuôi *E.coli* mang DNA plasmid vào ống Eppendorf 1,8 ml.

- Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, thu xác tế bào.
- Bổ xung 200 µl dung dịch I, trộn đều.
- Bổ xung 200 µl dung dịch II, lắc trộn đều.
- Bổ xung 350 µl dung dịch III, lắc nhẹ.
- Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 10 phút
- Dùng pipet chuyển dịch nổi sang ống Eppendorf có cột lọc.
- Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, rút cột lọc và đổ dịch phía dưới.
- Rửa DNA dưới đáy cột bằng 700 µl dung dịch rửa.
- Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, đổ dịch đáy ống.
- Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 2 phút.
- Chuyển cột lọc sang Eppendorf mới.
- Hòa tan DNA trong 100 µl.
- Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, thu DNA đã hòa tan.
- Kiểm tra độ tinh sạch DNA plasmid bằng quang phổ kế.

Bước 5: Xác định trình tự gen bằng máy tự động ABI 3100

Mỗi dòng gen được giải trình tự bằng 2 ống (1 ống với mỗi xuôi và 1 ống với mỗi ngược) theo cách tiến hành như sau:

+ Khuếch đại DNA plasmid bằng các dideoxynucleotid đã đánh dấu huỳnh quang.

Thành phần phản ứng:

Thành phần	Thể tích (μl)
H ₂ O	12,0
5x Buffer	3,5
Môi	1,5
BigDye	1,0
DNA plamid	2,0
Tổng thể tích	20 μl

Chu trình nhiệt của phản ứng như sau:

96°C	10 giây	} 25 chu kỳ
50°C	5 giây	
60°C	4 phút	
4°C	vô cùng	

+ Tinh sạch sản phẩm

- Bổ sung 2 μl dung dịch 125mM EDTA pH 8,0, 2 μl dung dịch NaOAc và 50 μl Ethanol 99% vào mỗi ống chứa 20 μl sản phẩm ở phản ứng trên.
- Vortex và để ở nhiệt độ phòng 15 phút.
- Ly tâm 14.000 vòng trong 20 phút, hút bỏ dịch nổi.
- Bổ sung 70 μl dung dịch Ethanol 70%, lắc đều.
- Ly tâm 14.000 vòng trong 10 phút, hút bỏ dịch nổi.
- Để khô DNA ở nhiệt độ phòng trong buồng tối.
- Cho 25 μl Hi-Di formamide, vortex.
- Biến tính trên máy ủ nhiệt 95 °C trong 2 phút rồi cắm nhanh trên đá 15 phút.
- Đưa mẫu vào máy xác định trình tự tự động ABI 3100.

Bước 6: Phân tích trình tự DNA HPV xác định genotype

Trình tự DNA HPV thu được được phân tích so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen quốc tế GenBank theo chương trình BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.3.3. Quy trình kỹ thuật xét nghiệm tế bào cổ tử cung theo phương pháp Papanicolaous (Pap smear)

2.3.2.1. Hóa chất

Ethanol 95%, Ethanol 70%, Ethanol 100%, Hematoxylin, hydrochlorid acid alcohol 1% (1% HCl + 70% Ethanol), OG6, acetic alcohol 1% (1% CH_3COOH + 70% Ethanol), Ethanol phosphotungstic acid 1%, Eosine 50, Xylen.

2.3.2.2. Kỹ thuật nhuộm

Xếp lam kính được phết tế bào cổ tử cung và đã cố định bằng cồn vào khay nhuộm.

- Nhúng 5 lần trong 95% Ethanol và để trong 10 phút.
- Nhúng 5 lần trong 70% Ethanol.
- Rửa trong dòng nước chảy nhẹ 3 phút.
- Nhúng 5 lần trong hematoxylin và để trong 4 phút.
- Rửa trong dòng nước chảy nhẹ đến khi nước không còn màu đỏ của hematoxylin.
- Nhúng 5 lần trong 1% hydrochloric acid alcohol (1% HCl + 70% Ethanol) và để trong 1 phút.
- Rửa trong dòng nước chảy ít nhất 10 phút.
- Kiểm tra sự bắt màu của tế bào ở vật kính 10 và vật kính 40.
- Nhúng 10 lần trong 95% Ethanol, lặp lại 2 lần ở 2 bình 95% Ethanol khác nhau.
- Nhúng 5 lần trong OG6 và để trong 2 phút.
- Nhúng 10 lần trong 95% Ethanol.
- Nhúng 5 lần trong 1% acetate alcohol (1% CH_3COOH + 70% Ethanol) và để trong 1 phút.
- Nhúng 5 lần trong 1% Ethanol phosphotungstic acid (1% phosphotungstic acid + 70% Ethanol) và để trong 1 phút.
- Nhúng 5 lần trong EA 50 và để trong 3 phút.
- Nhúng 10 lần trong 100% Ethanol, lặp lại 4 lần ở 4 bình 100% Ethanol khác nhau.
- Thấm khô dịch ở giá nhuộm.
- Nhúng 5 lần trong 100% Xylen, lặp lại 4 lần ở 4 bình 100% Xylen khác nhau.

2.3.2.3. Đọc kết quả

Tiêu bản tế bào học cổ tử cung đã nhuộm theo phương pháp Papanicolaous được đọc kết quả tại Khoa Giải phẫu bệnh, trường Đại học

Kanazawa-Nhật Bản và phân loại tổn thương theo hệ thống Bethesda năm 2001 (The 2001 Bethesda system Terminology).

2.4. Xử lý số liệu

Sử dụng phương pháp thống kê y sinh học, phân tích các kết quả thu được theo chương trình SPSS 15.0. Test χ^2 và Fisher's Exact Test được sử dụng trong so sánh giữa nhóm HPV DNA dương tính và nhóm HPV DNA âm tính. Đồng thời, sử dụng phân tích đơn biến để đánh giá sự liên quan giữa nhóm HPV DNA dương tính với các yếu tố nguy cơ gây nhiễm cũng như với các đồng nhiễm khác.

Hơn nữa, các số liệu còn được tiến hành phân tích hồi quy đa biến sử dụng phương pháp phân tích hồi quy Stepwise để đánh giá sự độc lập của các biến và sử dụng tỷ suất chênh (Odds ratio, OR) điều chỉnh với độ tin cậy 95% (95% confidence intervals, CIs) để kiểm tra sự liên quan độc lập giữa các biến. Giá trị $p \leq 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

2.5. Đạo đức nghiên cứu Y học

Đề tài được thông qua Hội đồng đạo đức Y sinh học Trường Đại học Y Hải Phòng theo đúng quy định về Đạo đức trong nghiên cứu khoa học của Bộ Y tế, Việt Nam.

Các đối tượng nghiên cứu đủ tiêu chuẩn lựa chọn được cung cấp các thông tin cụ thể về nghiên cứu, giải thích rõ ràng về những lợi ích và nguy cơ khi tham gia nghiên cứu. Đảm bảo có đủ thời gian để đối tượng nghiên cứu suy nghĩ, cân nhắc, hiểu rõ thông tin và tình nguyện ký cam kết tham gia nghiên cứu.

Các đối tượng nghiên cứu được tiếp tục cung cấp thông tin trong suốt thời gian tham gia nghiên cứu, có thể liên hệ với nghiên cứu viên nếu có thắc mắc và có quyền từ chối hoặc ngừng tham gia nghiên cứu vào bất cứ thời điểm nào.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tỷ lệ nhiễm HPV ở đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng và một số yếu tố liên quan

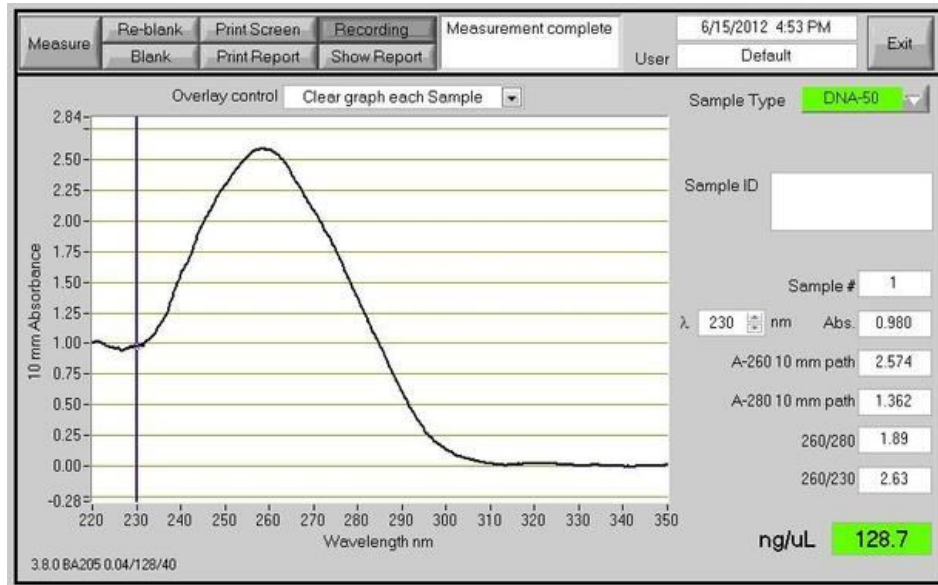
3.1.1. Tỷ lệ nhiễm HPV ở đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng

3.1.1.1. Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch DNA sau tách chiết

Kết quả nồng độ DNA tổng số sau tách chiết dao động trong khoảng từ 54 – 1639 ng/ μ l, trong đó nồng độ DNA tổng số trên 500 ng/ μ l chiếm 53,7%.

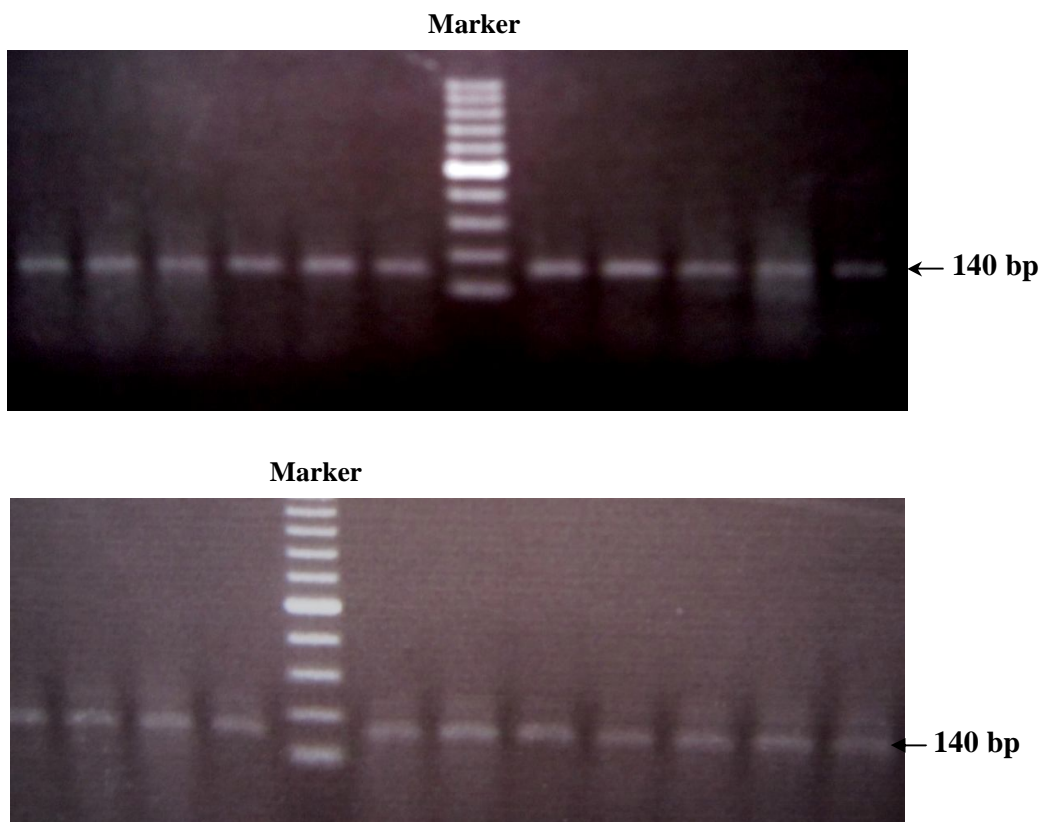
Sản phẩm DNA thu được đảm bảo độ tinh sạch phản ánh bằng giá trị OD_{268}/OD_{280} trong khoảng từ 1,70 đến 1,97. Như vậy sản phẩm DNA sau tách chiết đảm bảo chất lượng tinh sạch để có thể sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR nhân đoạn gen.

Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch DNA sau tách chiết được thể hiện trong phần phụ lục chương 2.



Hình 3.1. Kết quả kiểm tra độ tinh sạch và định lượng nồng độ DNA tổng số trên máy NanoDrop

3.1.1.2. Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm HPV ở đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng bằng phản ứng PCR



Hình 3.2. Kết quả khuếch đại 140 bp vùng gen L1 HPV bằng phản ứng PCR với môi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified

Nhận xét:

+ Trên hình ảnh điện di cho thấy đoạn gen L1 của HPV đã được nhân lên một cách đặc hiệu khi sử dụng môi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified, chỉ tạo ra một băng duy nhất. Các băng điện di sáng đồng nhất, bờ đều, sắc gọn. Điều này chứng tỏ sản phẩm PCR có chất lượng tốt và có thể sử dụng để xác định genotype HPV.

+ Kích thước sản phẩm PCR được đối chiếu trên thang DNA chuẩn (Marker) tương ứng với dự đoán lý thuyết của vùng gen được nhân lên là 140 bp. Những mẫu có sản phẩm PCR kích thước 140 bp là những mẫu có HPV DNA dương tính

Như vậy: Khi tiến hành khuếch đại vùng gen L1 HPV bằng phản ứng PCR trong tổng số 479 mẫu nghiên cứu, 246 mẫu sản phẩm PCR sử dụng môi

GP5+/GP6+original có kích thước 140 bp (HPV DNA dương tính) và 245 mẫu sản phẩm PCR sử dụng môi GP5+/GP6+ modified có kích thước 140 bp (HPV DNA dương tính). Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng, Việt Nam phát hiện bằng phản ứng PCR với môi GP5+/GP6+original là 51,4% và với môi GP5+/GP6+ modified là 51,1%.

3.1.2. Một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng

3.1.2.1. *Mối liên quan của tuổi, tình trạng hôn nhân, trình độ học vấn, tình trạng hút thuốc lá và sử dụng ma túy đến tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng*

Bảng 3.1. Mối liên quan của tuổi, tình trạng hôn nhân, trình độ học vấn, tình trạng hút thuốc lá và sử dụng ma túy đến tỷ lệ nhiễm HPV

Yếu tố liên quan		Gái mại dâm		HPV DNA				OR	95% CI	p
				(-)		(+)				
		n	%	n	%	N	%			
Tuổi	≤ 25	233	48,6	92	35,9	141	60,5	2,02	1,4 - 2,9	< 0,0001
	> 25	246	51,4	140	56,9	106	43,1		1	
Tình trạng hôn nhân	Độc thân	247	51,6	107	43,3	140	56,7	1,8	1,0 - 3,2	0,046
	Đang chung sống	62	12,9	36	58,1	26	41,9		1	
	Li dị, li thân, góa	170	35,5	90	52,9	80	47,1	1,5	0,99 - 2,2	0,058
Trình độ học vấn	Không	65	13,6	37	56,9	28	43,1	0,7	0,4 - 1,1	0,145
	Tiểu học - Trung học	414	86,4	195	47,1	219	52,9		1	
Hút thuốc lá	Không	333	69,5	143	42,9	190	57,1	2,1	1,4 - 3,1	< 0,0001
	Có	146	30,5	89	61,0	57	39,0		1	
Tiêm chích ma túy	Không	391	81,6	191	48,8	200	51,2		1	
	Có	88	18,4	41	46,6	47	53,4	1,1	0,7 - 1,7	0,724

Nhận xét:

+ Yếu tố tuổi có liên quan chặt chẽ với tình trạng nhiễm HPV ($p < 0,0001$), trong đó lứa tuổi dưới 25 có nguy cơ nhiễm HPV cao hơn khoảng 2 lần so với lứa tuổi trên 25 (95% CI: 1,4 - 2,9).

+ Tình trạng hôn nhân độc thân (chưa kết hôn) liên quan có ý nghĩa thống kê đến tình trạng nhiễm HPV ($p=0,046$). Đối tượng gái mại dâm sống độc thân chiếm 51,6% và có nguy cơ nhiễm HPV cao hơn 1,8 lần so với những đối tượng gái mại dâm đang chung sống với chồng (bạn tình) hoặc đã li thân, li dị, góa chồng.

+ 86,4% đối tượng gái mại dâm có trình độ học vấn ở bậc tiểu học hoặc trung học cơ sở ; 18,4% đối tượng gái mại dâm có sử dụng ma túy qua đường tĩnh mạch. Tuy nhiên, tình trạng tình trạng tiêm chích ma túy không liên quan có ý nghĩa với tình trạng nhiễm HPV sinh dục.

+ Tình trạng hút thuốc lá cũng liên quan rất chặt chẽ với p có nghĩa thống kê $< 0,0001$. Trong đó, đối tượng gái mại dâm không hút thuốc lá có nguy cơ nhiễm HPV cao hơn 2,1 lần so với đối tượng có hút thuốc lá (95% CI: 1,4 - 3,1).

3.1.2.2. Mối liên quan của tiền sử sản phụ khoa đến tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng

Bảng 3.2. Mối liên quan của tiền sử sản phụ khoa đến tỷ lệ nhiễm HPV

Yếu tố liên quan		Gái mại dâm		HPV DNA				OR	95% CI	p
				(-)		(+)				
		n	%	n	%	n	%			
Tuổi quan hệ tình dục đầu tiên	< 18	114	33,6	63	55,3	51	44,7	0,8	0,5 - 1,2	0,358
	≥ 18	225	66,4	111	49,3	114	50,7		1	
Tiền sử sản khoa	Chưa có thai	134	28,0	54	40,3	80	59,7	1,6	1,05 - 2,4	0,032
	Đã có thai	345	72,0	178	51,6	167	48,4		1	
Tuổi có thai	< 18	36	21,1	24	66,7	12	33,3	0,5	0,3 - 1,0	0,077
	≥ 18	309	78,9	154	50,2	155	49,8		1	
Biện pháp tránh thai	Không	70	14,6	36	51,4	34	48,6	0,9	0,5 - 1,5	0,607
	Có	409	85,4	196	47,9	213	52,1		1	
Sử dụng bao cao su	Không	128	37,8	66	51,6	62	48,4	1,0	0,6 - 1,5	1,000
	Có	211	62,2	108	51,2	103	48,8		1	
Tần suất sử dụng bao cao su	Không thường xuyên	212	62,5	110	51,9	102	48,1	0,94	0,6 - 1,5	0,823
	Thường xuyên	127	37,5	64	50,4	63	49,6		1	

Nhận xét:

+ Trong 479 đối tượng tham gia nghiên cứu, 33,6% gái mại dâm có hoạt động tình dục trước 18 tuổi. Khi phân tích đơn biến, không thấy sự liên quan có ý nghĩa giữa tuổi quan hệ tình dục đầu tiên và nguy cơ nhiễm HPV ($p=0,358$).

+ 345/479 gái mại dâm (72,0%) tiền sử đã có thai và 134 đối tượng gái mại dâm chưa có tiền sử mang thai lần nào. Nhóm đối tượng gái mại dâm chưa mang thai có nguy cơ nhiễm HPV cao hơn 1,6 lần so với nhóm đối tượng đã có tiền sử thai nghén, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p=0,032$.

+ Có 14,6% đối tượng gái mại dâm không sử dụng bất kỳ một hình thức tránh thai nào và 62,2% gái mại dâm áp dụng biện pháp tránh thai bằng cách sử dụng bao cao su. Tuy nhiên, chỉ có 37,5% trong số họ sử dụng bao cao su thường xuyên.

3.1.2.3. Mối liên quan của các bệnh lây truyền qua đường tình dục đến tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng

Bảng 3.3. Mối liên quan của các bệnh lây truyền qua đường tình dục đến tỷ lệ nhiễm HPV

Yếu tố liên quan		Gái mại dâm		HPV DNA				OR	95% CI	p
				(-)		(+)				
		N	%	n	%	n	%			
HIV	Dương tính	47	9,8	9	19,1	38	80,9	4,5	2,1 - 9,5	< 0,0001
	Âm tính	432	90,2	223	51,6	209	48,4		1	
HCV	Dương tính	70	14,6	37	52,9	33	47,1	0,8	0,5 - 1,4	0,440
	Âm tính	409	85,4	195	47,7	214	52,3		1	
HBV	Dương tính	33	6,9	13	39,4	20	60,6	1,5	0,7 - 3,0	0,367
	Âm tính	446	93,1	219	49,1	227	50,9		1	
<i>C.trachomatis</i>	Dương tính	26	5,4	7	26,9	19	73,1	2,7	1,1 - 6,5	0,027
	Âm tính	453	94,6	225	49,7	228	50,3		1	
<i>N.gonorrhoeae</i>	Dương tính	7	1,5	2	28,6	5	71,4	2,4	0,5 - 12,4	0,451
	Âm tính	472	98,5	230	48,7	242	51,3		1	

Nhận xét:

+ Trong nhóm đối tượng tham gia nghiên cứu, 145/479 (30,3%) trường hợp nhiễm ít nhất một bệnh lây truyền qua đường tình dục.

+ Tỷ lệ nhiễm HIV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng là 9,8%. Tình trạng nhiễm HIV liên quan rất chặt chẽ với nguy cơ nhiễm HPV đường sinh dục, đối tượng nhiễm HIV có nguy cơ nhiễm HPV cao hơn 4,5 lần so với nhóm không suy giảm miễn dịch mắc phải do HIV ($p < 0,0001$ và 95% CI: 2,1 - 9,5).

+ Tình trạng nhiễm HCV chiếm tỷ lệ cao nhất là 70/479 (14,6%) và có 6,9% đối tượng gái mại dâm nhiễm HBV. Tuy nhiên, sự liên quan giữa tình trạng nhiễm HCV, HBV và tình trạng nhiễm HPV không có ý nghĩa thống kê với $p=0,440$ và $p=0,367$.

+ Tỷ lệ gái mại dâm nhiễm trùng roi âm đạo *C.trachomatis* chiếm 5,4% nhưng có tới 73,1% gái mại dâm đồng nhiễm *C.trachomatis* và HPV. Sự liên quan giữa *C.trachomatis* và HPV có ý nghĩa với $p=0,027$.

+ Tỷ lệ gái mại dâm nhiễm *N.gonorrhoeae* thấp nhất (1,5%). Mặc dù đa số gái mại dâm nhiễm *N.gonorrhoeae* có đồng nhiễm HPV (71,4%) nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p=0,451$).

Bảng 3.4. Kết quả phân tích hồi quy đa biến giữa một số yếu tố liên quan có ý nghĩa thống kê với tình trạng nhiễm HPV

Yếu tố liên quan với tình trạng nhiễm HPV		Giải mại dân		Phân tích đơn biến			Phân tích đa biến		
		n	%	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Tuổi (năm)	≤ 25	233	48,6	2,02	1,4 - 2,9	< 0,0001	1,9	1,3 - 3,0	0,003
	> 25	246	51,4		1				
Tình trạng hôn nhân	Độc thân	247	51,6	1,8	1,0 - 3,2	0,046	1,0	0,6 - 1,7	0,97
	Đang chung sống	62	12,9		1		0,78	0,4 - 1,4	0,43
	Li dị, li thân, góa	170	35,5	1,5	0,99 - 2,2	0,058			
Hút thuốc lá	Không	333	69,5	2,1	1,4 - 3,1	< 0,0001	2,5	1,6 - 3,9	< 0,0001
	Có	146	30,5		1				
Tiền sử sản khoa	Chưa có thai	134	28,0	1,6	1,05 - 2,4	0,032	1,1	0,6 - 1,8	0,68
	Đã có thai	345	72,0		1				
HIV	Dương tính	47	9,8	4,5	2,1 - 9,5	< 0,0001	7,9	3,5 - 17,6	< 0,0001
	Âm tính	432	90,2		1				
<i>C.trachomatis</i>	Dương tính	26	5,4	2,7	1,1 - 6,5	0,027	2,4	0,9 - 5,9	0,66
	Âm tính	453	94,6		1				

Nhận xét:

Phân tích hồi quy đa biến hàm Stepwise những yếu tố liên quan có ý nghĩa thống kê với tình trạng nhiễm HPV từ phân tích đơn biến (Tuổi, tình trạng hôn nhân, hút thuốc lá, tiền sử sản khoa, HIV, *C.trachomatis*) đã kiểm định được:

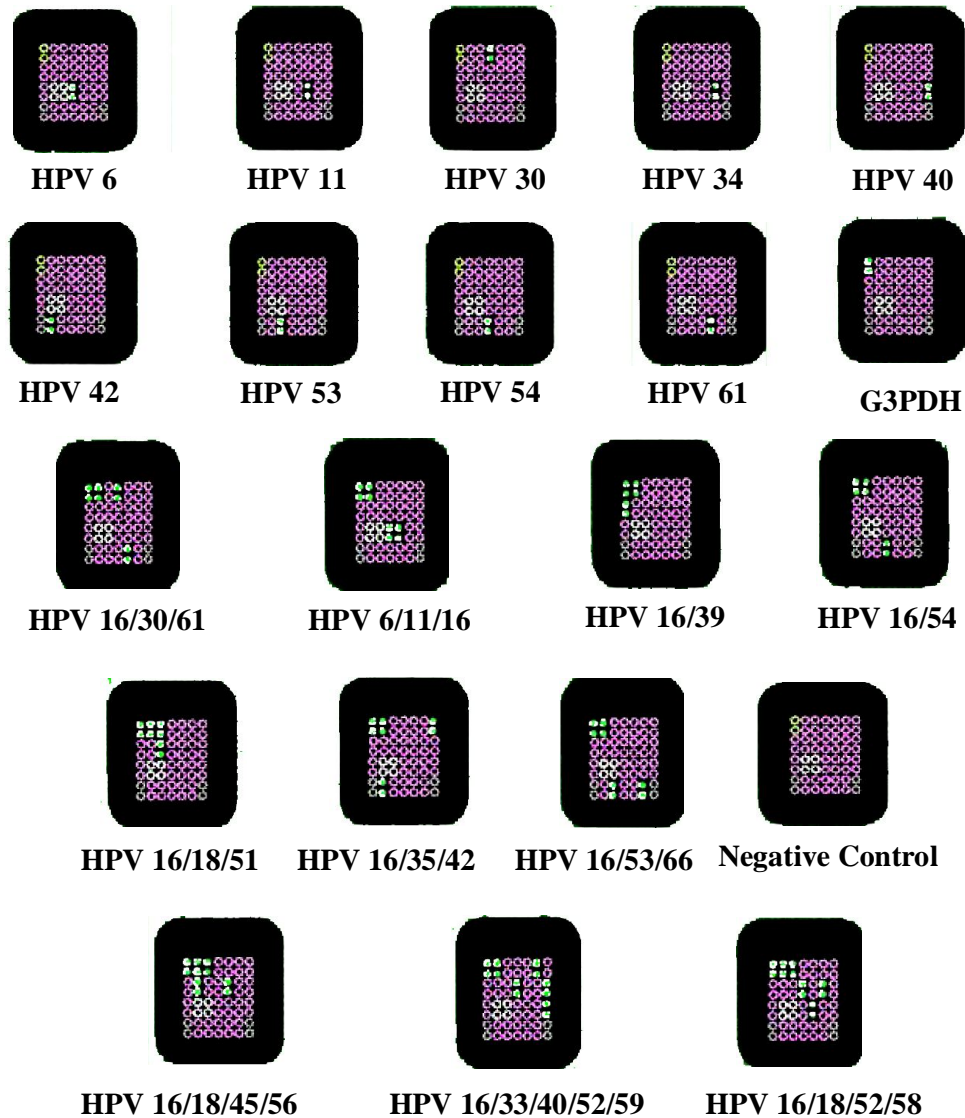
+ Tình trạng nhiễm HPV phụ thuộc vào những yếu tố tác động độc lập như: sự thay đổi của lứa tuổi, tình trạng hút thuốc lá và nhiễm HIV.

+ Tình trạng hôn nhân, tiền sử sản khoa và tình trạng nhiễm *C.trachomatis* là các yếu tố phụ thuộc (biến kết quả) của các yếu tố tác động khác tình trạng nhiễm HPV.

3.2. Sự phân bố genotype HPV trên gáy mại dâm tại Hải Phòng

3.2.1. Kết quả xác định genotype HPV bằng phương pháp DNA microarray và phương pháp giải trình tự sau tách dòng

3.2.1.1. Kết quả xác định genotype HPV bằng phương pháp DNA microarray



Hình 3.3. Kết quả xác định genotype HPV bằng kỹ thuật DNA microarray

Nhận xét:

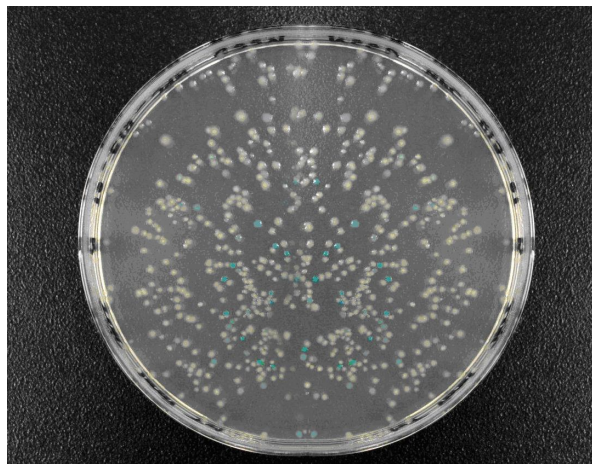
+ Trong tổng số 246 mẫu HPV DNA dương tính khi khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng mỗi GP5+/GP6+ original và 245 mẫu HPV DNA

đương tính khi khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng môi GP5+/GP6+ modified, 229 mẫu đã xác định được genotype HPV và 17 mẫu không xác định được genotype HPV bằng kỹ thuật lai trên DNA chip (DNA microarray) với kit GeneSquare HPV Typing DNA Microarray. Như vậy, 17 mẫu có HPV DNA dương tính nhưng chưa xác định genotype HPV cần tiếp tục xác định genotype HPV bằng phương pháp giải trình tự sau tách dòng.

+ Hình ảnh phát màu huỳnh quang của từng genotype HPV trong các giếng rõ ràng, sắc nét, không có hiện tượng lai giữa các giếng. Kết quả này cho phép xác định chính xác các genotype HPV.

3.2.1.2. Kết quả xác định genotype HPV bằng phương pháp giải trình tự gen sau tách dòng

100% đoạn gen L1 đã được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng môi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified của 17 mẫu HPV DNA dương tính nhưng không xác định được genotype HPV bằng phương pháp DNA microarray được ghép thành công vào vectơ tách dòng *pCR*[®]2.1 và biến nạp plasmid vào tế bào khả biến *E.coli* chủng InV α F'. Nuôi cấy và lựa chọn vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp. Sau đó, tách chiết, tinh sạch DNA plasmid và tiến hành giải trình tự gen. Hình ảnh kết quả giải trình tự gen được thể hiện trong phần phụ lục chương 3.



Hình 3.4. Kết quả biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* chủng InV α F'

Bảng 3.5. Kết quả xác định genotype HPV bằng giải trình tự gen sau tách dòng

TT	Mã bệnh nhân	HPV DNA	Kết quả giải trình tự gen
1.	HPC-005-09	Dương tính	HPV-26, HPV-62
2.	HPV-2-024	Dương tính	HPV-81
3.	HPV-2-043	Dương tính	HPV-JBE2
4.	HPV-2-045	Dương tính	HPC-70
5.	HPV-2-068	Dương tính	HPV-90 (JC9710)
6.	HPV-2-087	Dương tính	HPV-70
7.	HPV-2-090	Dương tính	HPV-81
8.	HPV-2-125	Dương tính	HPV-CP8304
9.	HPV-2-138	Dương tính	HPV-26
10.	HPV-2-171	Dương tính	HPV-JBE2
11.	HPV-2- 209	Dương tính	HPV-70, HPV-81
12.	FSW-10-045	Dương tính	HPV-CP8304
13.	FSW-10-095	Dương tính	HPV-90
14.	FSW-10-125	Dương tính	HPV 81
15.	FSW-10-178	Dương tính	Human/bacteria gene
16.	FSW-10-195	Dương tính	HPV-90
17.	FSW-10-201	Dương tính	HPV-CP8304

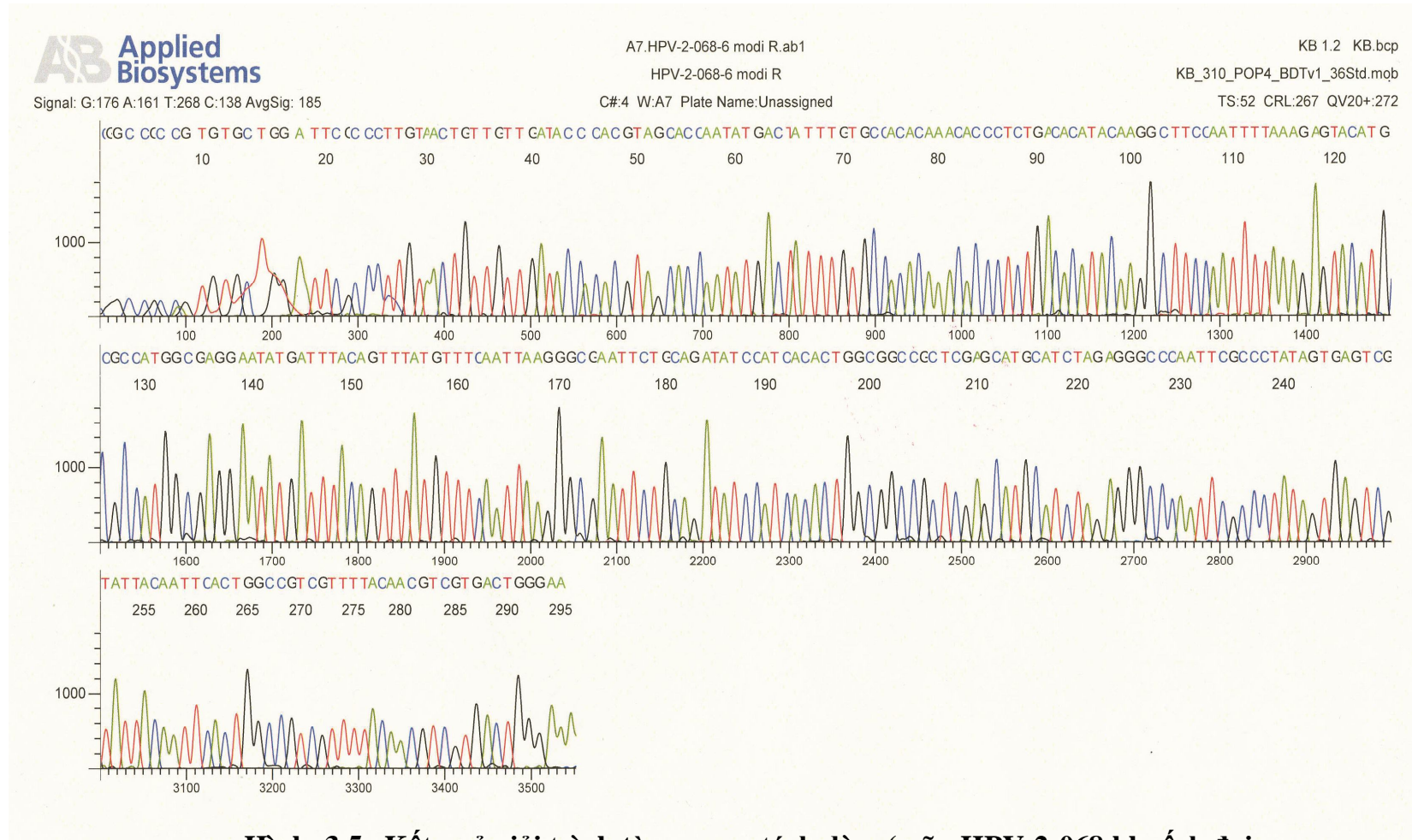
Nhận xét:

+ Với 17 mẫu tách dòng, 100% số mẫu đã xác định được trình tự gen trong đó 16/17 mẫu xác định được genotype HPV và 01/17 mẫu xác định được đoạn gen có kích thước 140 bp từ sản phẩm PCR sử dụng mồi GP5+/GP6+ original không phải là DNA HPV.

+ Tất cả các genotype HPV được xác định bằng phương pháp giải trình tự sau tách dòng là các genotype không có trình tự gen trên chip DNA của Kit GeneSquare HPV Typing DNA Microarray. Các genotype HPV được xác định là các genotype thuộc nhóm “nguy cơ thấp” và thuộc nhóm “chưa xác định được nguy cơ”.

Như vậy, với 246 mẫu HPV DNA dương tính có sản phẩm PCR kích thước 140 bp phát hiện bằng phản ứng PCR sử dụng mồi GP5+/GP6+ original và 245 mẫu có HPV DNA dương tính phát hiện bằng phản ứng PCR sử dụng GP5+/GP6+ modified, đã xác định được 245 mẫu có đoạn gen khuếch đại là HPV DNA và đã xác định được genotype HPV, xác định 01 mẫu có đoạn gen được khuếch đại bởi mồi GP5+/GP6+ original có kích thước 140 bp không phải là DNA HPV.

Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng, Việt Nam là 245/479 (51,1%).



Hình 3.5 . Kết quả giải trình tự gen sau tách dòng(mẫu HPV-2-068 khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng mồi GP5+/GP6+ modified).

**Human papillomavirus type 90 L1 gene for L1 capsid protein,
clone: cervical_GP_modified_068_06**

Sequence ID: dbj|AB542808.1

Query 1 CTCGCCATGGCGCATGTACTCTTTAAAATTGGAAGCCTTGTATGTGTCAGAGGGTGTGTTG 60

|||||

Sbjct 6892 CTCGCCATGGCGCATGTACTCTTTAAAATTGGAAGCCTTGTATGTGTCAGAGGGTGTGTTG 6833

Query 61 TGTGGCACAAATAGTCATATTGGTGCTACGT 91

|||||

Sbjct 6832 TGTGGCACAAATAGTCATATTGGTGCTACGT 6802

**Human papillomavirus type 90 DNA, complete genome, strain: 590 ,
clone: cervical_GP_original_068_03**

Sequence ID: dbj|AB601053.1

Query 1 CTCGCCATGGCGCATGTACTCTTTAAAATTGGAAGCCTTGTATGTGTCAGAGGGTGTGTTG 60

|||||

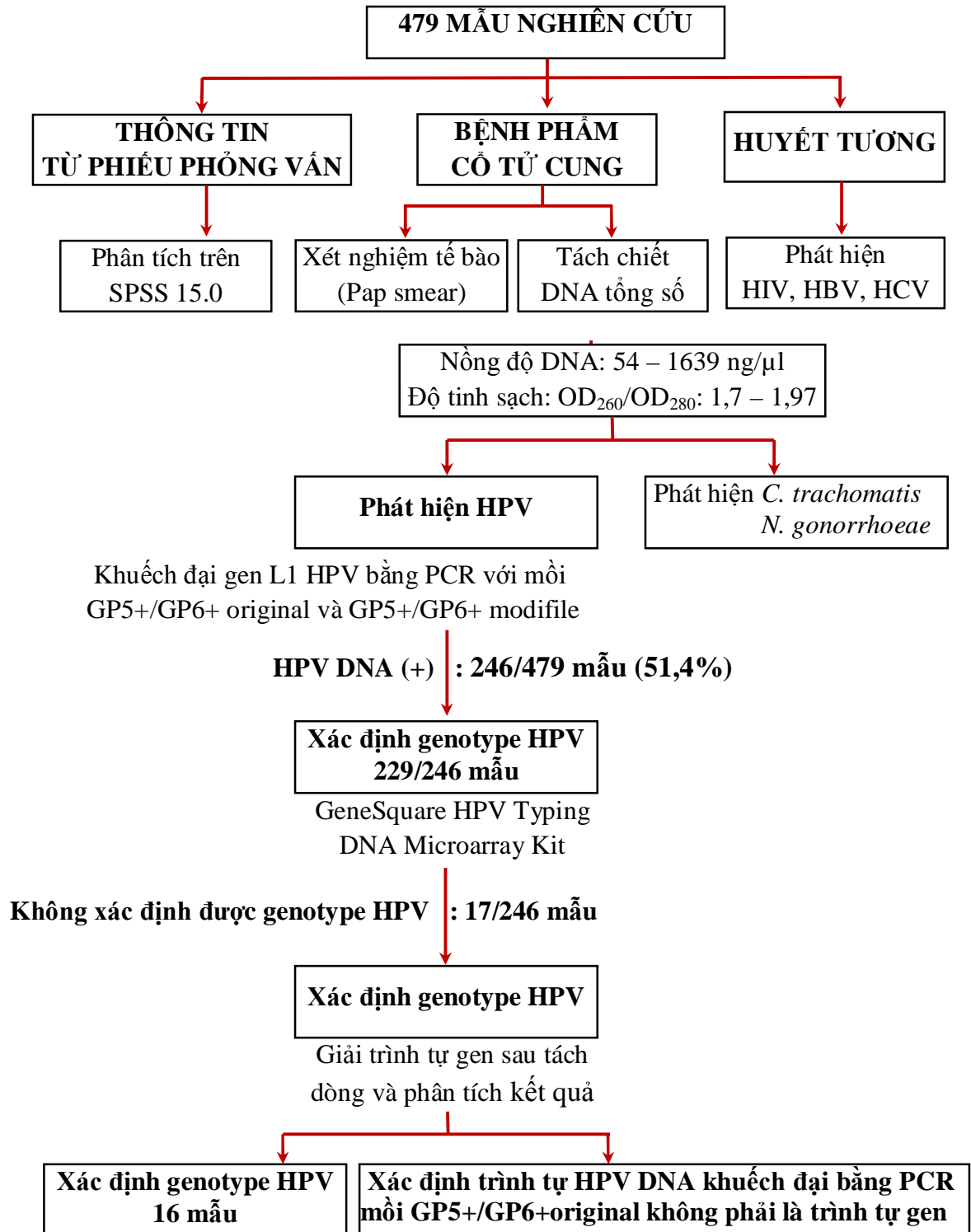
Sbjct 91 CTCGCCATGGCGCATGTACTCTTTAAAATTGGAAGCCTTGTATGTGTCAGAGGGTGTGTTG 32

Query 61 TGTGGCACAAATAGTCATATTGGTGCTACGT 91

|||||

Sbjct 31 TGTGGCACAAATAGTCATATTGGTGCTACGT 1

**Hình 3.6 : So sánh kết quả giải trình gen sau tách dòng (mẫu HPV-2-068)
với trình tự gen đã công bố trên GeneBank.**



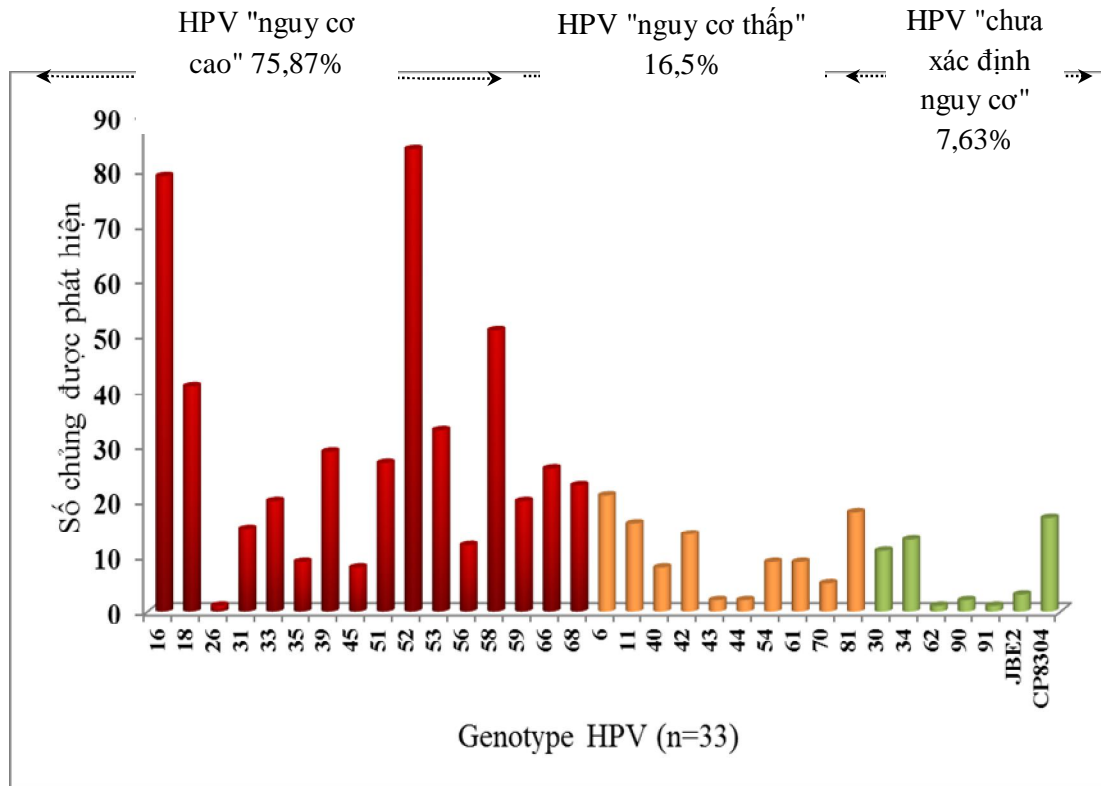
Hình 3.7. Sơ đồ kết quả xác định tỷ lệ nhiễm và genotype HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng.

3.2.2. Sự phân bố và tình trạng đơn đa nhiễm genotype HPV

3.2.2.1. Sự phân bố genotype HPV

Bảng 3.6. Sự phân bố genotype HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng

TT	Nhóm	Genotype	Số chủng	%
1.	Nhóm "nguy cơ cao"	HPV-16	79	12,53
2.		HPV-18	41	6,50
3.		HPV-26	1	0,15
4.		HPV-31	15	2,38
5.		HPV-33	20	3,17
6.		HPV-35	9	1,42
7.		HPV-39	29	4,60
8.		HPV-45	8	1,26
9.		HPV-51	27	4,28
10.		HPV-52	84	13,33
11.		HPV-53	33	5,23
12.		HPV-56	12	1,90
13.		HPV-58	51	8,09
14.		HPV-59	20	3,17
15.		HPV-66	26	4,12
16.		HPV-68	23	3,65
	Tổng số		478	75,87
17.	Nhóm "nguy cơ thấp"	HPV-6	21	3,33
18.		HPV-11	16	2,53
19.		HPV-40	8	1,26
20.		HPV-42	14	2,22
21.		HPV-43	2	0,31
22.		HPV-44	2	0,31
23.		HPV-54	9	1,42
24.		HPV-61	9	1,42
25.		HPV-70	5	0,79
26.		HPV-81	18	2,85
	Tổng số		104	16,50
27.	Nhóm "chưa xác định nguy cơ"	HPV-30	11	1,74
28.		HPV-34	13	2,06
29.		HPV-62	1	0,15
30.		HPV-90	2	0,31
31.		HPV-91	1	0,15
32.		HPV-JBE2	3	0,47
33.		HPV-CP8304	17	2,69
	Tổng số		48	7,63



Hình 3.8. Sự phân bố genotype HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng

Nhận xét:

+ Từ 245 mẫu HPV DNA dương tính, 33 genotype và 630 chủng HPV đã được xác định. Các chủng HPV được xác định gồm:

- 478 chủng genotype HPV nhóm "nguy cơ cao" chiếm 75,87% (478/630).
- 104 chủng genotype HPV nhóm "nguy cơ thấp" chiếm 16,5% (104/630).
- 48 chủng genotype HPV nhóm "chưa xác định nguy cơ" chiếm 7,63% (48/630).

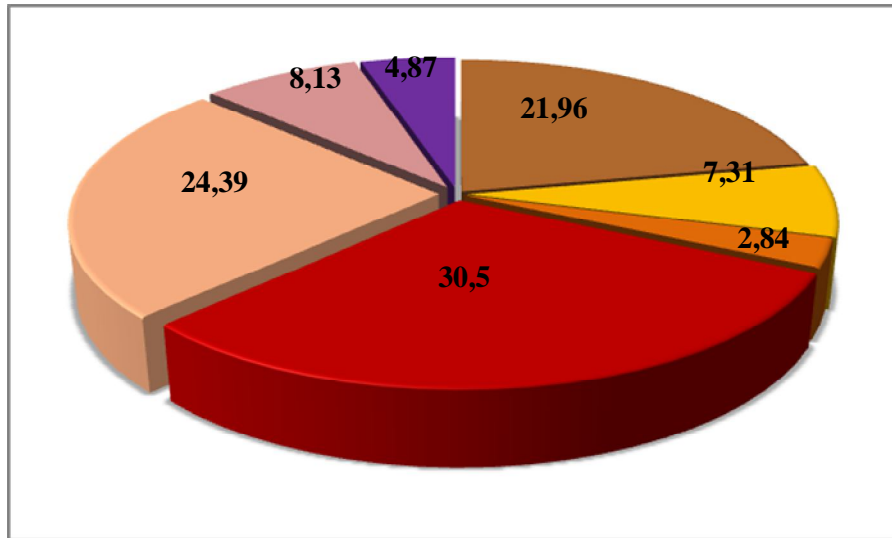
+ Trong 33 genotype HPV được xác định, genotype HPV 52 là genotype chiếm tỷ lệ cao nhất 13,33% (84/630 chủng), tiếp đến là genotype HPV 16 chiếm 12,53% (79/630 chủng) và HPV 58 chiếm 8,09% (51/630 chủng). HPV 18 xác định được 41 chủng, chiếm 6,5%.

Genotype HPV 6 và HPV 11 chiếm 3,33% và 2,53%.

3.2.2.2. Tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV

Bảng 3.7. Tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng

Tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV		n	%
Loại đơn nhiễm		79	32,11
	Đơn nhiễm genotype "nguy cơ cao"	54	21,96
	Đơn nhiễm genotype "nguy cơ thấp"	18	7,31
	Đơn nhiễm genotype "chưa xác định nguy cơ"	7	2,84
Loại đa nhiễm		167	67,89
	Đa nhiễm genotype "nguy cơ cao"	75	30,5
	Đa nhiễm genotype "nguy cơ cao + nguy cơ thấp"	60	24,39
	Đa nhiễm genotype "nguy cơ cao + chưa xác định nguy cơ"	20	8,13
	Đa nhiễm genotype "nguy cơ cao + nguy cơ thấp + chưa xác định nguy cơ"	12	4,87
	Đa nhiễm genotype "nguy cơ thấp"	0	0
	Đa nhiễm genotype "chưa xác định nguy cơ thấp"	0	0



- Đa nhiễm HPV "nguy cơ cao": 30,5%
- Đa nhiễm HPV "nguy cơ cao + nguy cơ thấp": 24,39%
- Đa nhiễm HPV "nguy cơ cao + chưa xác định nguy cơ": 8,13%
- Đa nhiễm HPV "nguy cơ cao + nguy cơ thấp + chưa xác định nguy cơ": 4,87%
- Đơn nhiễm HPV "nguy cơ cao": 21,96%
- Đơn nhiễm HPV "nguy cơ thấp": 7,31%
- Đơn nhiễm HPV "chưa xác định nguy cơ": 2,84%

Hình 3.9. Tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV ở gái mại dâm tại Hải Phòng

Nhận xét:

+ Từ 245 trường hợp nhiễm HPV, có 79 trường hợp đơn nhiễm một genotype HPV (32,11%) và 167 trường hợp đa nhiễm genotype HPV (nhiễm ≥ 2 genotype HPV) chiếm 67,89%.

+ Tình trạng đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao" chiếm tỷ lệ cao nhất: 30,3%, đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao + nguy cơ thấp" chiếm 24,39% và tiếp đến là tình trạng đơn nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao" chiếm 21,96%.

+ Tình trạng đơn nhiễm genotype HPV và đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ thấp + chưa xác định nguy cơ" chiếm tỷ lệ rất thấp.

3.2.2.3. Một số yếu tố liên quan đến tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV

Lựa chọn những yếu tố liên quan có ý nghĩa thống kê với tình trạng nhiễm HPV để phân tích mối liên quan với tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV. Một số yếu tố liên quan như sau:

* **Mối liên quan của lứa tuổi và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV**

Bảng 3.8. Mối liên quan của lứa tuổi và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV

Tuổi	N	Đơn nhiễm genotype HPV					Đa nhiễm genotype HPV				
		n	%	OR	95% CI	p	n	%	OR	95% CI	p
≤ 25	233	40	17,2	1,06	0,7 - 1,7	0,807	101	43,3	2,08	1,4 - 3,1	< 0,0001
> 25	246	39	15,9	1			66	26,8	1		

Nhận xét:

+ Yếu tố tuổi liên quan có ý nghĩa mật thiết với tình trạng đa nhiễm genotype HPV ($p < 0,0001$) nhưng không liên quan tới tình trạng đơn nhiễm genotype HPV ($p = 0,807$).

+ Phân tích sự liên quan của yếu tố tuổi với các loại đa nhiễm genotype HPV cho thấy:

- Yếu tố tuổi chỉ liên quan chặt chẽ với loại đa nhiễm genotype "nguy cơ cao + nguy cơ thấp" (OR: 3,1; 95% CI: 1,7 - 5,5; $p < 0,0001$). Trong đó, đối tượng gái mại dâm dưới 25 tuổi có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao + nguy cơ thấp" gấp 3,1 lần so với đối tượng gái mại dâm trên 25 tuổi ($p < 0,0001$).

*** Mối liên quan của tình trạng hôn nhân và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV**

Bảng 3.9. Mối liên quan của tình trạng hôn nhân và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV

Tình trạng hôn nhân	N	Đơn nhiễm genotype HPV					Đa nhiễm genotype HPV				
		n	%	OR	95% CI	p	n	%	OR	95% CI	p
Độc thân	247	42	17,0	1,3	0,6 - 3,1	0,563	99	40,1	1,6	0,9 - 3,0	0,143
Đang chung sống	62	8	12,9	1			18	29,0	1		
Li dị, li thân, góa	170	29	17,1	0,95	0,6 - 1,6	0,896	50	29,4	1,6	1,0 - 2,4	0,029

Nhận xét:

+ Tình trạng hôn nhân liên quan có ý nghĩa với tình trạng đa nhiễm genotype HPV nhưng không liên quan với tình trạng đơn nhiễm genotype HPV.

Tình trạng gái mại dâm đã li dị, đang sống li thân hoặc góa chồng có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV cao hơn 1,6 lần so với nhóm đang chung sống với chồng hoặc bạn tình, sự khác biệt có ý nghĩa với $p=0,029$.

+ Phân tích mối liên quan giữa tình trạng hôn nhân và các loại đa nhiễm genotype HPV cho thấy:

- Tình trạng độc thân có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao + nguy cơ thấp" cao gấp 3,7 lần so với nhóm đang chung sống với chồng hoặc bạn tình (OR:3,7; 95% CI: 1,1 - 12,4; $p=0,023$).

- Tình trạng gái mại dâm đã li dị, đang sống li thân hoặc góa chồng có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao + nguy cơ thấp + chưa xác định nguy cơ" cao gấp 5,3 lần so với nhóm đang chung sống với chồng hoặc bạn tình (OR:5,3; 95% CI: 1,4 - 20,4; $p=0,018$).

*** Mối liên quan của tình trạng hút thuốc lá và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV**

Bảng 3.10. Mối liên quan của tình trạng hút thuốc lá và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV

Tình trạng hút thuốc lá	N	Đơn nhiễm genotype HPV					Đa nhiễm genotype HPV				
		n	%	OR	95% CI	p	n	%	OR	95% CI	p
Có	146	24	16,4	1,0	0,6 - 1,6	1,000	33	22,6	0,4	0,3 - 0,7	< 0,0001
Không	333	55	16,2	1			134	40,2	2,3	1,4 - 3,6	

Nhận xét:

+ Tình trạng hút thuốc lá liên quan chặt chẽ với tình trạng đa nhiễm genotype HPV, những gái mại dâm hút thuốc lá có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV thấp hơn so với nhóm không hút thuốc lá và ngược lại, nhóm gái mại dâm không hút thuốc lá có nguy cơ nhiễm HPV cao hơn nhóm hút thuốc lá từ 1,4 - 3,6 lần ($p < 0,0001$).

+ Phân tích sự liên quan giữa tình trạng hút thuốc lá và loại đa nhiễm genotype HPV cho thấy: Đối tượng gái mại dâm không hút thuốc lá có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao + nguy cơ thấp" cao gấp 2,1 lần so với nhóm hút thuốc lá, sự khác biệt có ý nghĩa với $p = 0,035$ (OR:2,1; 95% CI: 1,0 - 4,1; $p = 0,035$).

*** Mọi liên quan của tiền sử có thai và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV**

Bảng 3.11. Mọi liên quan của tiền sử có thai và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV

Tiền sử có thai	N	Đơn nhiễm genotype HPV					Đa nhiễm genotype HPV				
		n	%	OR	95% CI	p	n	%	OR	95% CI	p
Chưa có thai	134	21	15,7	0,9	0,5 - 1,6	0,786	59	44,0	1,7	1,1 - 2,6	0,01
Đã có tiền sử thai nghén	345	58	16,8	1			108	108	1		

Nhận xét:

+ Tiền sử thai nghén có liên quan tới tình trạng đa nhiễm genotype HPV, đối tượng gái mại dâm chưa có thai lần nào có nguy cơ nhiễm HPV cao hơn 1,7 lần so với nhóm đối tượng gái mại dâm đã có tiền sử thai nghén. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p=0,01$.

+ Phân tích mối liên quan giữa tiền sử thai nghén và tình trạng đa nhiễm genotype HPV cho thấy, tiền sử thai nghén chỉ liên quan tới tình trạng đa nhiễm chung mà không liên quan có ý nghĩa tới từng loại đa nhiễm riêng. Phân tích bảng 2x2 (Crosstabs2x2) giữa tiền sử thai nghén với từng loại đa nhiễm cho kết quả như sau:

- Giữa tiền sử thai nghén và tình trạng đa nhiễm genotype "nguy cơ cao": OR: 0,7; 95% CI: 0,4 - 1,1; $p=0,159$.

- Giữa tiền sử thai nghén và tình trạng đa nhiễm genotype "nguy cơ cao", genotype "nguy cơ thấp": OR: 0,7; 95% CI: 0,4 - 1,2; $p=0,219$.

- Giữa tiền sử thai nghén và tình trạng đa nhiễm genotype "nguy cơ cao", genotype "chưa xác định nguy cơ": OR: 0,5; 95% CI: 0,2 - 1,4; $p=0,215$.

- Giữa tiền sử thai nghén và đa nhiễm genotype "nguy cơ cao", "nguy cơ thấp", "chưa xác định nguy cơ": OR: 0,8; 95% CI: 0,2 - 2,6; $p=0,746$.

*** Môi liên quan của tình trạng nhiễm HIV và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV**

Bảng 3.12. Môi liên quan của tình trạng nhiễm HIV và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV

HIV	N	Đơn nhiễm genotype HPV					Đa nhiễm genotype HPV				
		n	%	OR	95% CI	p	n	%	OR	95% CI	p
Dương tính	47	15	31,9	2,6	1,4 - 5,1	0,006	23	48,9	1,9	1,0 - 3,5	0,037
Âm tính	432	64	14,7	1			144	33,3	1		

Nhận xét:

+ Tình trạng nhiễm HIV có liên quan chặt chẽ với tình trạng đơn nhiễm ($p=0,006$) và đa nhiễm genotype HPV ($p=0,037$).

Tuy nhiên khi phân tích sự liên quan giữa tình trạng nhiễm HIV và từng loại đơn nhiễm genotype HPV không thấy tình trạng nhiễm HIV chỉ liên quan đến tình trạng đơn nhiễm chung mà không có sự biệt giữa các loại đơn nhiễm genotype HPV.

Phân tích sự liên quan giữa tình trạng nhiễm HIV với loại đa nhiễm HPV cho thấy tình trạng nhiễm HIV liên quan có ý nghĩa với đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao + chưa xác định nguy cơ". Nhóm đối tượng gái mại dâm nhiễm HIV có nguy cơ đa nhiễm genotype "nguy cơ cao + chưa xác định nguy" cao hơn nhóm gái mại dâm không nhiễm HIV từ 1,6 đến 11,9 lần (OR: 4,4; 95% CI: 1,6 - 11,9; $p=0,009$).

*** Mọi liên quan của tình trạng nhiễm *C.trachomatis* và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV**

Bảng 3.13. Mọi liên quan của tình trạng nhiễm *C.trachomatis* và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV

<i>C.trachomatis</i>	N	Đơn nhiễm genotype HPV					Đa nhiễm genotype HPV				
		n	%	OR	95% CI	p	n	%	OR	95% CI	p
Dương tính	26	4	15,4	0,9	0,3 - 1,7	1,000	15	57,7	2,7	1,2 - 6,0	0.018
Âm tính	453	75	16,1	1			152	33,6			

Nhận xét:

+ Tình trạng nhiễm *C.trachomatis* liên quan có ý nghĩa ($p=0,018$) với tình trạng đa nhiễm genotype HPV. Đối tượng gái mại dâm nhiễm *C.trachomatis* có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV cao gấp 2,7 lần so với nhóm không nhiễm *C.trachomatis*.

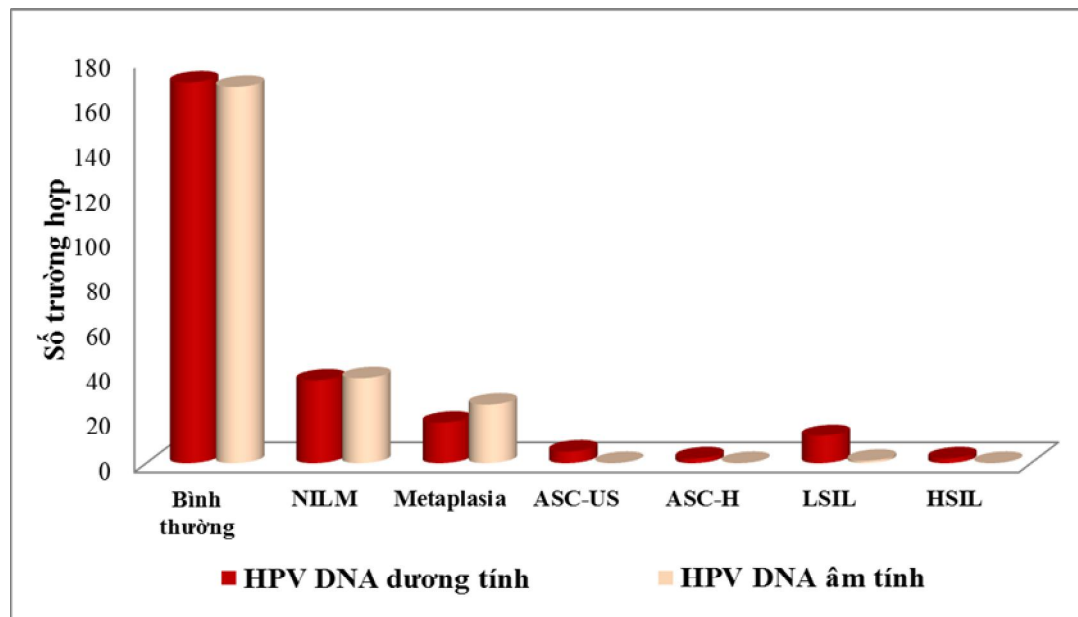
+ Phân tích mối liên quan giữa tình trạng nhiễm *C.trachomatis* và tình trạng đa nhiễm genotype HPV cho thấy, tình trạng nhiễm *C.trachomatis* chỉ liên quan tới tình trạng đa nhiễm chung mà không liên quan có ý nghĩa tới từng loại đa nhiễm riêng.

3.3. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và genotype HPV

3.3.1. Kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung trên gái mại dâm tại Hải Phòng

Bảng 3.14. Kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung trên gái mại dâm tại Hải Phòng

Kết quả xét nghiệm tế bào	Gái mại dâm		HPV DNA			
			Âm tính		Dương tính	
	n	%	n	%	n	%
Tế bào bình thường	338	70,6	168	49,7	170	50,5
Tế bào biểu mô biến đổi lành tính do viêm	75	15,7	38	50,7	37	49,3
Tế bào chuyển sản	44	9,2	26	59,1	18	40,9
ASC-US	5	1,0	0	0	5	100
ASC-H	2	0,4	0	0	2	100
LSIL	13	2,7	1	7,7	12	92,3
HSIL	2	0,4	0	0	2	92,3



Hình 3.10. Kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung trên gái mại dâm tại Hải Phòng

Nhận xét:

+ Với 479 mẫu xét nghiệm tế bào cổ tử cung, 338 mẫu có kết quả xét nghiệm bình thường (70,6%), 75 trường hợp có tế bào biểu mô biến đổi lành tính do viêm, 44 trường hợp có các tế bào chuyên sản và 22 trường hợp có thay đổi bất thường của tế bào biểu mô cổ tử cung bao gồm 5 trường hợp có thay đổi tế bào biểu mô gai không điển hình ý nghĩa chưa xác định ASC-US, 2 trường hợp có thay đổi tế bào biểu mô gai không điển hình nhưng không loại trừ được tổn thương trong biểu mô mức độ cao ASC-H, 13 trường hợp có thay đổi tổn thương nội biểu mô gai mức độ thấp LSIL, 2 trường hợp có thay đổi tổn thương nội biểu mô gai mức độ cao HSIL. Chưa phát hiện trường hợp ung thư biểu mô hoặc ung thư tế bào tuyến cổ tử cung trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng.

+ Ở nhóm kết quả xét nghiệm tế bào học cổ tử cung bình thường (các tế bào hình thái bình thường, tế bào biểu mô biến đổi lành tính do viêm, tế bào chuyên sản) có tỷ lệ HPV DNA âm tính và DNA HPV dương tính tương đương nhau. Tuy nhiên, ở nhóm kết quả xét nghiệm tế bào học cổ tử cung bất thường (ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL) có tỷ lệ nhiễm HPV chiếm đa số, HPV DNA âm tính chiếm một tỷ lệ rất thấp.

3.3.2. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và HPV

Tiến hành phân tích đơn biến giữa kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung với kết quả sàng lọc nhiễm HPV và genotype HPV đã được xác định. Đánh giá mối liên quan giữa nhóm nhiễm HPV (nhóm nguy cơ) và nhóm không nhiễm HPV (nhóm không nguy cơ) với sự biến đổi tế bào cổ tử cung. Kết quả phân tích ở bảng 3.16 như sau:

Bảng 3.15. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và HPV

HPV	Gái mại dâm		Xét nghiệm tế bào học				Phân tích đơn biến		
			Bất thường		Bình thường				
	N	%	n	%	n	%	OR	95% CI	p
HPV DNA (+)	246	51,4	21	8,9	225	91,1	21,6	2,9 - 162,3	< 0,0001
HPV DNA (-)	233	48,6	1	0,4	233	94,6	1		
HPV -16	79	16,5	11	13,9	68	86,1	5,7	2,4 - 13,7	< 0,0001
HPV-18	41	8,6	1	2,4	40	97,6	2,0	0,2 - 13,4	0,710
HPV-26	1	0,2	0	0	1	100			1,000
HPV-31	15	3,1	1	6,7	14	93,3	0,7	0,08 - 5,3	0,511
HPV-33	20	4,2	2	10,0	18	90,0	0,4	0,09 - 1,9	0,232
HPV-35	9	1,9	2	22,2	7	77,8	0,2	0,03 - 0,8	0,060
HPV-39	29	6,1	5	17,2	24	82,8	5,3	1,8 - 15,6	0,007
HPV-45	8	1,7	0	0	8	100			1,000
HPV-51	27	5,6	4	14,8	23	85,2	4,2	1,3 - 13,4	0,029
HPV-52	84	17,5	10	11,9	74	88,1	4,3	1,8 - 10,4	0,002
HPV-53	33	6,9	5	15,2	28	84,8	4,5	1,5 - 13,1	0,013
HPV-56	12	2,5	0	0	12	100			1,000
HPV-58	51	10,6	2	3,9	49	96,1	1,2	0,3 - 5,3	1,000
HPV-59	20	4,2	1	5,0	19	95,0	0,9	0,1 - 7,1	1,000
HPV-66	26	5,4	3	11,5	23	88,5	0,3	0,9 - 1,2	0,110
HPV-68	23	4,8	4	17,4	19	82,6	5,1	1,6 - 16,6	0,017
HPV-6	21	4,4	2	9,5	19	90,5	0,4	0,09 - 2,0	0,250
HPV-11	16	3,3	1	6,3	15	93,8	0,7	0,09 - 5,6	0,534
HPV-40	8	1,7	1	12,5	7	87,5	0,3	0,03 - 2,8	0,315
HPV-42	14	2,9	1	7,1	13	92,9	0,6	0,7 - 4,9	0,487
HPV-43	2	0,4	1	50	1	50	0,04	0,87 - 11,2	0,090
HPV-44	2	0,4	2	100	0	0			0,070
HPV-54	9	1,9	1	11,1	8	88,9	0,3	0,04 - 3,1	0,347
HPV-61	9	1,9	0	0	9	100			1,000
HPV-70	5	1,0	0	0	5	100			1,000
HPV-81	18	3,8	0	0	18	100			1,000
HPV-30	11	2,3	2	18,2	9	81,8	0,2	0,04 - 1,0	0,086
HPV-34	13	2,7	2	15,4	11	84,6	0,2	0,05 - 1,2	0,116
HPV-62	1	0,2	0	0	1	100			1,000
HPV-90	2	0,4	0	0	2	100			1,000
HPV-91	1	0,2	0	0	1	100			1,000
HPV-JBE2	3	0,6	0	0	3	100			1,000
HPV-CP8304	17	3,5	2	11,8	15	88,2	0,3	0,07 - 1,6	0,181

Nhận xét:

+ Sự biến đổi tế bào cổ tử cung có liên quan chặt chẽ với tình trạng nhiễm HPV đường sinh dục. Đối tượng nhiễm HPV có kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung bất thường cao gấp 21,6 lần so với nhóm không nhiễm HPV, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$.

+ Những thay đổi bất thường của tế bào biểu mô cổ tử cung chỉ liên quan có ý nghĩa với những genotype HPV nhóm "nguy cơ cao" như HPV-16, HPV-39, HPV-51, HPV-52, HPV-53 và HPV-68. Đặc biệt, có sự khác biệt rõ rệt về kết quả tế bào học giữa nhóm nhiễm và nhóm không nhiễm HPV-16 ($p < 0,0001$), HPV-52 ($p = 0,002$).

Các genotype HPV nhóm "nguy cơ thấp" và nhóm "chưa xác định được nguy cơ" liên quan không ý nghĩa với sự biến đổi tế bào cổ tử cung.

Trong nghiên cứu này, không có sự khác biệt về biến đổi tế bào cổ tử cung trên đối tượng gái mại dâm nhiễm HPV-18 và không nhiễm HPV-18 ($p = 0,710$).

3.3.3. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và một số yếu tố nguy cơ khác

Tiến hành phân tích đơn biến đánh giá mối liên quan của một số yếu tố nguy cơ với tình trạng nhiễm HPV để phân tích mối liên quan những thay đổi bất thường của tế bào cổ tử cung trên những đối tượng gái mại dâm nhiễm HPV.

Nhận xét:

+ Yếu tố lứa tuổi, tình trạng hôn nhân, tình trạng hút thuốc lá, tiền sử sản khoa và tình trạng nhiễm *C. trachomatis* liên quan có ý nghĩa với tình trạng nhiễm HPV nhưng không có sự khác biệt về kết quả tế bào học.

+ Tình trạng nhiễm HIV liên quan chặt chẽ với tình trạng nhiễm HPV và những thay đổi bất thường tế bào biểu mô cổ tử cung. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về kết quả xét nghiệm Pap smear giữa nhóm nhiễm và nhóm không nhiễm HIV với $p < 0,0001$.

Bảng 3.16. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và một số yếu tố nguy cơ khác

Yếu tố liên quan		Gái mại dâm		Xét nghiệm tế bào học				Phân tích đơn biến		
				Bất thường		Bình thường				
		n	%	n	%	n	%	OR	95% CI	p
Tuổi	≤ 25	233	48,6	11	4,7	222	95,3	1,0	0,9 - 2,5	1,000
	> 25	246	51,4	11	4,5	235	95,5	1		
Tình trạng hôn nhân	Độc thân	247	51,6	15	6,1	232	93,9	1,7	0,84 - 4,6	0,116
	Đang chung sống	62	12,9	0	0	62	100	1		
	Li dị, li thân, góa	170	35,5	7	4,1	163	95,9	1		
Tình trạng hút thuốc lá	Không	333	69,5	16	4,8	317	95,2	0,84	0,3 - 2,2	0,817
	Có	146	30,5	6	4,1	140	95,9	1		
Tiền sử sản khoa	Đã có thai	345	72,0	15	4,3	330	95,7	1,2	0,5 - 3,0	0,635
	Chưa có thai	134	28,0	7	5,2	127	94,8	1		
HIV	Dương tính	47	9,8	9	19,1	38	80,9	7,6	3,0 - 19,0	< 0,0001
	Âm tính	432	90,2	13	3,0	419	97,0	1		
<i>C. trachomatis</i>	Dương tính	26	5,4	3	11,5	23	88,4	2,9	0,8 - 10,8	0,110
	Âm tính	453	94,6	19	4,2	434	95,8	1		

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng và một số yếu tố liên quan

4.1.1. Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng

Nghiên cứu được thực hiện với sự tình nguyện tham gia của 479 gái mại dâm đang tập trung quản lý tại Trung tâm phục hồi nhân phẩm Thanh Xuân, Hải Phòng. Tất cả đối tượng gái mại dâm được thu thập thông tin từ phiếu phỏng vấn, lấy máu (xác định HIV, HCV, HBV), khám sản phụ khoa và lấy bệnh phẩm cổ tử cung nhằm sàng lọc một số bệnh lây truyền qua đường tình dục (HPV, *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae*) bằng phản ứng khuếch đại gen, phản ứng PCR.

PCR là phương pháp mới đã mang lại một cuộc cách mạng trong di truyền phân tử cũng như trong nghiên cứu phân tích gen. Phản ứng PCR là phản ứng hóa sinh phụ thuộc nhiệt độ với sự tham gia của một loại enzyme chịu nhiệt DNA polymerase, các đoạn oligonucleotid mồi, DNA khuôn và một số thành phần khác như dung dịch đệm và các nucleotide. PCR có độ nhạy và tính chính xác rất cao, kết quả phản ứng thành công phụ thuộc chủ yếu vào chất lượng các thành phần tham gia phản ứng. Một trong những vai trò tiên quyết đánh giá sự thành công của phản ứng là chất lượng DNA khuôn, trong đó nồng độ và độ tinh sạch của khuôn là những yếu tố quan trọng nhất.

Với 479 mẫu dịch bệnh phẩm cổ tử cung được tiến hành tách chiết DNA tổng số theo đúng quy trình kỹ thuật của kit, nồng độ DNA tổng số sau tách chiết có giá trị trong khoảng từ 54 – 1.639 ng/ μ l. Đây là khoảng dao động tương đối rộng và có sự chênh lệch lớn về nồng độ DNA khuôn cho phản ứng PCR. Do đó, chúng tôi tiến hành pha loãng lượng DNA tổng số bằng nước cất tinh sạch để đồng nhất nồng độ DNA trong khoảng chuẩn từ 50 – 500 ng/ μ l nhằm mục đích tối ưu hóa phản ứng nhân bản gen.

Khuôn của PCR rất đa dạng và nồng độ khuôn cần thiết cho mỗi phản ứng tùy thuộc vào nguồn gốc khuôn. Nồng độ DNA khuôn quá lớn không chỉ có thể làm giảm hiệu suất của DNA polymerase mà còn có thể làm tăng tổng hợp những sản phẩm phụ không mong muốn. Với DNA bacteriophage cần khoảng 20pg cho mỗi phản ứng và như vậy, nồng độ DNA để tối ưu hóa phản ứng PCR trong khoảng từ 50 – 500 ng/ μ l [34].

Để đảm bảo 100% mẫu sản phẩm DNA khuôn hoàn toàn tinh sạch, không tạp nhiễm và không bị đứt gãy thì quá trình tiến hành tách chiết phải được thực hiện trong điều kiện đảm bảo vô trùng tuyệt đối với quy trình chuẩn theo đúng hướng dẫn của hãng sản xuất kit. Đồng thời, tiến hành kiểm tra chặt chẽ độ tinh sạch của DNA khuôn trên máy đo quang phổ NanoDrop. Mật độ quang của sản phẩm DNA sau tách chiết trong nghiên cứu đo được ở bước sóng 260/280 nm dao động từ 1,70 đến 1,97. Như vậy, mẫu sản phẩm DNA tổng số sau tách chiết hoàn toàn đảm bảo độ tinh sạch để sử dụng làm khuôn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Để xác định tỷ lệ nhiễm HPV đường sinh dục ở đối tượng gái mại dâm trong nghiên cứu, DNA tổng số sau tách chiết đã đảm bảo về nồng độ và độ tinh sạch được tiến hành khuếch đại 140 bp trên vùng gen L1 HPV bằng phản ứng PCR sử dụng hai loại môi là GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified.

Lựa chọn oligonucleotid môi là một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất cùng với DNA khuôn quyết định tính đặc hiệu cũng như sự thành công của phản ứng PCR. Các đoạn oligonucleotid môi có chiều dài khoảng 20-30 nucleotid thường đặc hiệu hơn cho đoạn gen đích trên DNA khuôn. Nồng độ môi sử dụng cho PCR khác nhau theo từng thí nghiệm và tỷ lệ môi/khuôn đóng vai trò đặc biệt quan trọng giúp PCR thành công. Nếu nồng độ môi quá lớn sẽ không chỉ gây hiện tượng ức chế phản ứng mà còn hình thành những sản phẩm phụ không mong muốn do bắt cặp nhầm.

Sản phẩm HPV DNA được khuếch đại sau phản ứng PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2% và hình ảnh điện di được ghi lại trên máy soi chụp ảnh gel. Trên hình ảnh điện di (hình 3.1) cho thấy đoạn gen L1 của HPV từ mẫu bệnh phẩm cổ tử cung đã được nhân lên một cách đặc hiệu khi sử dụng môi GP5+/GP6+ original và môi GP5+/GP6+ modified, chỉ tạo ra một băng duy nhất, không có sản phẩm phụ. Các băng điện di sáng đồng nhất, bờ đều, sắc gọn, chứng tỏ sản phẩm PCR có chất lượng tốt và có thể sử dụng để xác định genotype HPV.

Kích thước sản phẩm PCR được đối chiếu trên thang DNA chuẩn (Marker) tương ứng với chiều dài dự đoán lý thuyết của vùng gen được nhân lên là 140 bp. Những mẫu có sản phẩm PCR kích thước 140 bp là những mẫu có HPV DNA dương tính.

Trong tổng số 479 mẫu nghiên cứu, 246 mẫu có kích thước 140 bp (HPV DNA dương tính) khi khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng môi GP5+/GP6+ original và 245 mẫu có kích thước 140 bp (HPV DNA dương tính) khi khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng môi GP5+/GP6+ modified. Tỷ lệ nhiễm HPV đường sinh dục trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng phát hiện bằng phản ứng PCR với môi GP5+/GP6+ original là 51,4% và với GP5+/GP6+ modified là 51,1%. Sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm HPV trong nghiên cứu phụ thuộc vào độ đặc hiệu của hai loại môi GP5+/GP6+ được sử dụng trong phản ứng PCR, do đó, tỷ lệ nhiễm HPV sẽ được xác định dựa trên kết quả giải trình tự gen mẫu sản phẩm PCR không tương đồng khi khuếch đại bằng môi GP5+/GP6+ original và môi GP5+/GP6+ modified.

Theo báo cáo kết quả phân tích tổng hợp năm 2007 (meta-analysis) từ 78 nghiên cứu khác nhau trên 157.879 phụ nữ có xét nghiệm tế bào học cổ tử cung bình thường, tỷ lệ nhiễm HPV trên toàn thế giới là 10,4% trong đó, châu Phi (22,1%) và Trung Mỹ (20,4%) là những khu vực có tỷ lệ nhiễm HPV sinh

dục nữ cao nhất. Châu Âu (8,1%) và châu Á (8,0%) có tỷ lệ nhiễm HPV tương đương. Như vậy, đến năm 2007, ước tính chung có khoảng 291 triệu phụ nữ trên khắp thế giới nhiễm HPV, khoảng 32% số họ nhiễm HPV-16, HPV-18 và khoảng 80% phụ nữ nhiễm HPV ít nhất một lần trong suốt đời sống tình dục [14], [16], [60].

Đến năm 2010, một nghiên cứu khác phân tích tổng hợp trên hơn 1 triệu (1.016.719) phụ nữ có xét nghiệm tế bào học cổ tử cung bình thường đã báo cáo tỷ lệ nhiễm HPV toàn cầu là 11,7% trong đó, châu Phi và châu Mỹ vẫn là hai châu lục có tỷ lệ nhiễm HPV cao nhất trên thế giới [61]. Kết quả báo cáo chứng tỏ tỷ lệ nhiễm HPV trong cộng đồng dân cư trên thế giới đang có xu hướng tăng nhanh, trong đó có sự góp phần không nhỏ của nhóm đối tượng gái mại dâm. Do đó, hướng nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm đang là vấn đề được quan tâm ở khắp các châu lục trên thế giới.

Nghiên cứu trên 503 đối tượng gái mại dâm tại thành phố cảng Mombasa của Kenya, châu Phi báo cáo tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm ở khu vực này là 45,5% [62]. Tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tại Peru, Tây Nam Mỹ (50,6%) tương đồng với kết quả báo cáo về tỷ lệ nhiễm HPV trên 495 gái mại dâm tại Mexico, Mỹ La tinh là 48,9% [52], [55].

Kết quả báo cáo tỷ lệ nhiễm HPV trên 734 đối tượng gái mại dâm được thường xuyên quản lý sàng lọc các bệnh lây truyền qua đường tình dục ở thủ đô Madrid, Tây Ban Nha, phía Nam châu Âu là 39,0% [54]. Tuy nhiên, khi nghiên cứu trên 653 gái mại dâm tại Ghent, thành phố lớn thứ 2 của Bỉ, phía Bắc châu Âu nhưng không được quản lý sàng lọc các bệnh lây truyền qua đường tình dục, tỷ lệ nhiễm HPV cao rõ rệt là 77,4% [56].

Khoa Y tế công cộng Trường Đại học Sydney nghiên cứu trên 288 đối tượng gái mại dâm được quản lý sàng lọc các bệnh lây truyền qua đường tình dục tại Sydney, thủ đô nước Úc báo cáo kết quả xác định tỷ lệ nhiễm HPV là 31,9% [63].

Như vậy, khi so sánh với các kết quả nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm HPV trên thế giới đã công bố có thể nhận xét tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tăng cao rõ rệt so với tỷ lệ nhiễm HPV trong cộng đồng, và kết quả nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng tương đồng với kết quả nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm được tập trung quản lý tại các trung tâm y tế ở các châu lục khác trên thế giới như châu Phi, châu Mỹ, châu Âu và châu Úc.

Tại châu Á, theo kết quả phân tích tổng hợp từ 11 nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm HPV đường sinh dục trên 4198 gái mại dâm cho thấy tỷ lệ nhiễm HPV ở đối tượng gái mại dâm dao động từ 12,8% đến 84,8%, cao gấp 10 lần so với tỷ lệ nhiễm HPV trong cộng đồng [50], [64].

Nghiên cứu so sánh về tỷ lệ nhiễm HPV giữa nhóm đối tượng gái mại dâm được thường xuyên quản lý các bệnh lây truyền qua đường tình dục và nhóm đối tượng gái mại dâm không được quản lý các bệnh lây truyền qua đường tình dục tại Seoul-Hàn Quốc cho thấy tỷ lệ nhiễm HPV sinh dục ở hai nhóm đối tượng có sự khác biệt rõ rệt là 47,0% và 83,5% [49], [65]. Kết quả này phản ánh rõ vai trò đặc biệt quan trọng của chương trình giám sát trọng điểm các bệnh lây truyền qua đường tình dục ở các quốc gia.

Tại Việt Nam, theo kết quả nghiên cứu năm 2003 của nhóm tác giả Phạm Thị Hoàng Anh và cộng sự về tỷ lệ nhiễm HPV ở cộng đồng dân cư nữ 15 đến 69 tuổi tại thành phố Hồ Chí Minh và tại Hà Nội cho thấy, có sự khác biệt lớn về tỷ lệ nhiễm HPV tại miền Nam và miền Bắc Việt Nam. Tỷ lệ nhiễm HPV ở cộng đồng dân cư nữ tại thành phố Hồ Chí Minh là 10,9% cao gấp

khoảng 5 lần so với tại Hà Nội (2,0%). Kết quả này giải thích cho sự chênh lệch về tỷ lệ UTCTC ở miền Nam cao gấp 4 lần so với ở miền Bắc Việt Nam [66].

Để phân tích rõ hơn về nguyên nhân dẫn tới tình trạng tăng nhanh số lượng bệnh nhân UTCTC tại Miền Nam Việt Nam, tác giả Hernandez thuộc trung tâm nghiên cứu ung thư Trường Đại học Hawaii (Mỹ) đã phối hợp với viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm HPV trên 282 đối tượng gái mại dâm tại tỉnh Sóc Trăng cho thấy tỷ lệ nhiễm HPV chiếm tới 85,0% và với kết quả nghiên cứu này, nhóm tác giả khẳng định HPV là tác nhân lây truyền qua đường tình dục phổ biến nhất ở đối tượng gái mại dâm tại miền Nam Việt Nam [41]. Tuy nhiên, đến nay vẫn chưa có công bố chính thức nào về tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tại miền Bắc Việt Nam.

Với mong muốn cung cấp thông tin về tỷ lệ nhiễm HPV trên nhóm đối tượng có khả năng làm lây lan nhanh các bệnh lây truyền qua đường tình dục nói chung và lây truyền HPV nói riêng tại miền Bắc Việt Nam, nhóm nghiên cứu chúng tôi đã xác định tỷ lệ nhiễm HPV trên 479 gái mại dâm tại Hải Phòng, thành phố cảng lớn nhất khu vực duyên hải Bắc Bộ là 51,1%. Từ kết quả này, có thể nhận định tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tại miền Bắc Việt Nam mặc dù thấp hơn so với tỷ lệ nhiễm tại miền Nam Việt Nam nhưng đã có sự tăng nhanh tình trạng nhiễm HPV trong nhóm đối tượng này. Kết quả tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm ở Hải Phòng trong nghiên cứu tương đồng với tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tại một số quốc gia lân cận như Kyoto - Nhật Bản (52,6%), Manila - Philippin (57,2%); PhnomPenh - Campuchia (41,1%) nhưng cao hơn tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm ở thủ đô Singapore - Singapore (14,4%); Songkla - Thái Lan (22,9%); Bali - Indonesia (38,3%); tỉnh Quảng Tây, phía Nam Trung Quốc (38,9%). Tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng thấp hơn rõ rệt so với tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tại

Dhaka - Bangladesh (75,8%), Bengal - Ấn Độ (73,3%) và tại tỉnh Hồ Châu, phía Nam Trung Quốc (66,7%) [17], [42], [43], [45], [46], [47], [48], [50], [51], [67].

4.1.2. Một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng

Với sự gia tăng nhanh chóng của số lượng bệnh nhân nhiễm mới và số trường hợp tử vong bởi các bệnh lý ác tính liên quan đến HPV, gánh nặng bệnh tật do HPV đang là vấn đề có ý nghĩa chiến lược đáng chú ý của công tác chăm sóc sức khỏe cộng đồng. Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới WHO (World Health Organization), mỗi năm trên thế giới, tính riêng UTCTC đã có khoảng 493.000 ca mắc mới và khoảng 274.000 trường hợp tử vong do UTCTC. Do đó, việc tìm hiểu những yếu tố liên quan tới tình trạng nhiễm HPV, những nguy cơ làm tăng khả năng nhiễm HPV là mối quan tâm lớn của các nhà nghiên cứu và của đa số phụ nữ trên thế giới. Kết quả nghiên cứu phân tích, đánh giá mối liên quan của những yếu tố làm tăng nguy cơ nhiễm HPV có ý nghĩa quan trọng giúp phòng chống lây nhiễm HPV.

Để phân tích mối liên quan của một số yếu tố tới tình trạng nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm, chúng tôi tiến hành thu thập thông tin từ phiếu phỏng vấn và phân tích đơn biến bằng phần mềm SPSS 15.0. Đồng thời, tiến hành phân tích hồi quy đa biến để kiểm định mối liên quan giữa các yếu tố phụ thuộc (các biến phụ thuộc: biến kết quả) với tình trạng nhiễm HPV và mối liên quan giữa các yếu tố độc lập (biến độc lập: biến tác động) với tình trạng nhiễm HPV.

4.1.2.1. Mối liên quan của lứa tuổi, tình trạng hôn nhân, trình độ học vấn, tình trạng hút thuốc lá và sử dụng ma túy đến tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng

HPV là tác nhân lây truyền qua đường tình dục do đó tỷ lệ nhiễm HPV phụ thuộc vào hành vi tình dục của các cá thể trong cộng đồng. Sự thay đổi về hành vi tình dục ở các lứa tuổi khác nhau sẽ dẫn đến thay đổi về tỷ lệ nhiễm HPV.

Theo kết quả nghiên cứu tổng hợp dịch tễ học về sự phân bố tỷ lệ nhiễm HPV theo độ tuổi của nhóm tác giả trường Đại học Bắc Carolina nước Anh trên 70 quốc gia cho thấy, tỷ lệ nhiễm HPV thay đổi theo lứa tuổi, đạt đỉnh cao nhất ở nhóm phụ nữ trẻ dưới 25 tuổi, sau đó giảm dần đến tuổi trung niên và lại đạt đỉnh cao lần 2 ở độ tuổi 50 ngoại trừ châu Á (tỷ lệ nhiễm HPV chỉ đạt 1 đỉnh cao nhất ở nhóm phụ nữ trẻ dưới 25 tuổi) [14]. So sánh về tỷ lệ nhiễm HPV ở nhóm phụ nữ tuổi trẻ dưới 25 tuổi và nhóm trên 45 tuổi cho thấy, tỷ lệ nhiễm HPV ở nhóm tuổi trẻ dưới 25 cao gấp 10 lần so với nhóm tuổi trên 45 [60].

Sự phân bố theo độ tuổi của HPV có thể giải thích do tỷ lệ nhiễm HPV đạt đỉnh cao nhất trong ba năm đầu sau khi hoạt động tình dục, chiếm khoảng 50% tổng số trường hợp nhiễm mới [60]. Đồng thời, sự thay đổi về môi trường pH âm đạo theo độ tuổi vừa là hậu quả, vừa là nguyên nhân liên quan tới nguy cơ nhiễm các bệnh lây truyền qua đường tình dục và sự nhiễm dai dẳng HPV đường sinh dục. Bình thường, trạng thái pH acid $\leq 4,5$ của âm đạo luôn được duy trì bởi vi khuẩn *Lactobacillus spp.* tổng hợp acid lactic từ quá trình thoái hóa glucose dự trữ dưới dạng glycogen trong các tế bào niêm mạc âm đạo theo con đường đường phân yếm khí. Ở môi trường pH acid, âm đạo giảm nguy cơ nhiễm các bệnh lây truyền qua đường tình dục. Khi đường sinh dục bị viêm nhiễm bởi các tác nhân khác sẽ làm giảm quá trình tổng hợp acid lactic, giảm vai trò bảo vệ của *Lactobacillus spp.*. Theo kết quả nghiên cứu của Trung tâm nghiên cứu dịch tễ học ung thư Hoa Kỳ, tỷ lệ nhiễm HPV có liên quan chặt chẽ với tình trạng tăng pH âm đạo ở nhóm phụ nữ dưới 25 tuổi [60].

Mặc dù yếu tố hormone trong cơ chế lây nhiễm HPV cũng như trong quá trình phát triển UTCTC chưa được chứng minh hoàn toàn, nhưng một số nghiên cứu chỉ ra rằng có sự tăng tỷ lệ nhiễm HPV ở những người sử dụng thuốc tránh thai. Nồng độ hormon sinh dục thay đổi theo lứa tuổi ảnh hưởng tới mức độ hoạt động của các receptor estrogen trên tế bào biểu mô vảy cổ tử

cung cũng là yếu tố ảnh hưởng tới nguy cơ nhiễm HPV. Khi nồng độ hormon estrogen tăng, các receptor estrogen tế bào biểu mô vảy cổ tử cung ở trạng thái hoạt động mạnh mẽ đặc biệt ở lớp tế bào đáy, lớp tế bào xâm nhiễm của HPV, tạo điều kiện thuận lợi cho gen E2 HPV gắn với các receptor giúp HPV dễ dàng xâm nhập và tăng sinh. Ở những phụ nữ tuổi trẻ dưới 25 hoặc những phụ nữ sử dụng thuốc tránh thai đường uống trên 6 năm, nồng độ hormon sinh dục tăng cao là cơ hội thuận lợi nhất cho quá trình xâm nhiễm của HPV [69]. Estrogen có thể có vai trò tác động trong quá trình chuyển đổi tế bào sừng hình trụ thành tế bào vùng cổ tử cung ngoài cũng như hình thành các vùng biến đổi. Hơn nữa, trong 1/3 các trường hợp UTCTC xuất hiện tăng enzym aromatase, enzym có chức năng chuyển androgen thành estrogen. Chất ức chế ung thư BRCA1 có chức năng giảm tác động giải mã do estrogen gây nên. E6 và E7 tác động trực tiếp vào BRCA1 và trung hòa hoạt động ức chế của chất ức chế này [70].

Những nghiên cứu dịch tễ học về HPV đã phát hiện rất sớm sự liên quan giữa HPV và độ tuổi, tỷ lệ nhiễm HPV cao hơn ở những phụ nữ trẻ tuổi sau đó giảm dần theo sự tăng lên của độ tuổi tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm dai dẳng HPV lại cao hơn ở những phụ nữ lớn tuổi và có hiện tượng nhiễm HPV tăng cao trở lại ở độ tuổi 50. Điều này thể giải thích do sự suy giảm về đáp ứng miễn dịch và sự thay đổi nội tiết tố của thời kỳ tiền mãn kinh. Hơn nữa, sự thay đổi trong hành vi tình dục của phụ nữ độ tuổi này cũng như sự tăng về số lượng bạn tình của họ trong độ tuổi trung niên cũng có thể là nguyên nhân gây tăng tỷ lệ nhiễm HPV [71].

Phân tích mối liên quan giữa lứa tuổi và tình trạng nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng cho thấy, yếu tố lứa tuổi có liên quan chặt chẽ với tình trạng nhiễm HPV và tỷ lệ nhiễm HPV có đỉnh cao nhất ở lứa tuổi dưới 25, cao gấp khoảng 2 lần so với tỷ lệ nhiễm HPV ở lứa tuổi trên 25. Như

vậy, tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng phân bố theo lứa tuổi tương đồng như ở các khu vực khác trên thế giới.

Theo kết quả phân tích đơn biến, tình trạng hôn nhân của đối tượng gái mại dâm trong nghiên cứu cũng liên quan có ý nghĩa đến tình trạng nhiễm HPV. Tuy nhiên, khi phân tích hồi quy đa biến kiểm định tác động của tình trạng hôn nhân tới nguy cơ nhiễm HPV chứng tỏ tình trạng hôn nhân là yếu tố tác động phụ thuộc. Đa số gái mại dâm có tình trạng hôn nhân độc thân (chưa kết hôn hoặc kết hôn nhưng đã li dị, li thân, góa chồng), chỉ có 12,9% gái mại dâm vẫn đang chung sống cùng chồng hoặc bạn tình. Những đối tượng gái mại dâm chưa kết hôn có nguy cơ nhiễm HPV cao gấp 1,8 lần so với những đối tượng gái mại dâm đã kết hôn hoặc đang chung sống với bạn tình. Điều này có thể liên quan tới số lượng bạn tình của gái mại dâm chưa kết hôn cao hơn so với đối tượng gái mại dâm khác.

Hút thuốc lá được báo cáo là yếu tố nguy cơ tác động đến nguy cơ nhiễm HPV và quá trình hình thành UTCTC [72]. Theo kết quả nghiên cứu của Gunnell và cộng sự, hút thuốc lá có tác dụng hiệp đồng với HPV 16 trong sự tiến triển UTCTC, nguy cơ UTCTC của người nhiễm HPV 16 có hút thuốc lá cao gấp 27 lần so với người nhiễm HPV 16 nhưng không hút thuốc lá [72], [73].

Chất cotinine và nicotine trong thuốc lá có thể gây hoạt hóa nitrosamine, làm đứt gãy DNA và làm giảm đáp ứng miễn dịch tại biểu mô cổ tử cung đặc biệt ức chế quá trình đáp ứng miễn dịch thông qua Th2, tạo điều kiện cho HPV có thể tồn tại dai dẳng trong lớp biểu mô gây biến đổi tế bào. Đồng thời, thuốc lá còn có vai trò tác động thúc đẩy quá trình tiến triển dạng tiền ung thư thông qua sự mất cân bằng giữa các cytokine Th1 và Th2 gây kích thích tổng hợp interleukin 10 và giảm nồng độ IFN- α , IFN- γ , đây là hai yếu tố hoạt tử u có tác dụng tiêu diệt tế bào UTCTC [73].

Trong tổng số 479 gái mại dâm tham gia nghiên cứu có 146 gái mại dâm hút thuốc lá và 88 gái mại dâm có tiêm chích ma túy, như vậy tỷ lệ hút thuốc lá và tiêm chích ma túy trên gái mại dâm tại Hải Phòng là 30,5% và 18,4%. Kết quả phân tích mối liên quan về nguy cơ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm trong nghiên cứu (Bảng 3.1) cho thấy tình trạng hút thuốc lá có mối liên quan rất chặt chẽ với nguy cơ nhiễm HPV, tuy nhiên, đối tượng không hút thuốc lá lại có nguy cơ nhiễm HPV cao gấp 2,1 lần so với đối tượng có hút thuốc lá. Kết quả nghiên cứu này dường như ngược lại với kết quả nghiên cứu về nguy cơ nhiễm HPV trong đối tượng cộng đồng dân cư nữ của các nghiên cứu trước. Để giải thích cho kết quả này, nhóm nghiên cứu gợi ý tới nguyên nhân do sự sụt giảm số lượng bạn tình của đối tượng gái mại dâm hút thuốc lá so với đối tượng gái mại dâm không hút thuốc lá. Tuy nhiên, hạn chế của nghiên cứu là chưa thu thập được chính xác số lượng bạn tình của gái mại dâm trong phiếu phỏng vấn, do đó, chưa có số liệu cụ thể để so sánh số lượng bạn tình giữa nhóm gái mại dâm hút thuốc lá và nhóm gái mại dâm không hút thuốc lá.

4.1.2.2. Mối liên quan của tiền sử sản phụ khoa đến tỷ lệ nhiễm HPV ở gái mại dâm tại Hải Phòng

Theo kết quả nghiên cứu dịch tễ học, tỷ lệ nhiễm mới HPV ở phụ nữ trẻ chiếm khoảng 20-50% trong 3 đến 4 năm đầu sau hoạt động tình dục đầu tiên [74]. Tình trạng quan hệ tình dục sớm không chỉ có nguy cơ nhiễm HPV mà còn có nguy cơ đồng nhiễm các bệnh khác lây truyền qua đường tình dục, đặc biệt là HIV và *C.trachomatis*.

Tuổi bắt đầu quan hệ tình dục khác nhau giữa các khu vực. Ở các nước phát triển, tuổi quan hệ tình dục lần đầu tiên đang có xu hướng giảm dần và ở các nước đang phát triển, tuổi bắt đầu quan hệ tình dục thường duy trì trong khoảng 15 đến 24 tuổi [75]. Xu hướng tăng tỷ lệ nhiễm HPV theo sự trẻ hóa của độ tuổi là một gợi ý quan trọng trong kế hoạch triển khai vắc xin phòng bệnh.

Kết quả bảng 3.2 thể hiện một tỷ lệ không nhỏ gái mại dâm có hoạt động tình dục trước 18 tuổi (33,6%) và tỷ lệ nhiễm HPV ở nhóm đối tượng này là 44,7%. Tuy nhiên, kết quả phân tích đơn biến và đa biến đánh giá tác động của tuổi quan hệ tình dục đầu tiên với tỷ lệ nhiễm HPV trong nghiên cứu này chưa thấy sự liên quan có ý nghĩa thống kê. Như vậy, không có sự khác biệt về nguy cơ nhiễm HPV giữa nhóm đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng quan hệ tình dục sớm trước 18 tuổi và quan hệ tình dục sau 18 tuổi.

Đa số đối tượng gái mại dâm trong nghiên cứu đều có tiền sử mang thai. Nhóm đối tượng gái mại dâm chưa mang thai chiếm tỷ lệ thấp (28,0%) nhưng là nhóm đối tượng có nguy cơ nhiễm HPV cao gấp 1,6 lần so với nhóm gái mại dâm đã có tiền sử mang thai. Kết quả phân tích đơn biến có ý nghĩa thống kê với $p=0,031$. Theo các kết quả công bố trước đây đánh giá tỷ lệ nhiễm HPV trên nhóm dân cư nữ có tiền sử thai nghén, phụ nữ đã có tiền sử mang thai có tỷ lệ nhiễm HPV cao hơn so với nhóm phụ nữ chưa mang thai và tỷ lệ nhiễm HPV cao nhất ở 3 tháng cuối của thai kỳ [76]. Như vậy, nguy cơ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm đã mang thai có sự khác biệt rõ rệt với nhóm thai phụ trọng cộng đồng dân cư, có lẽ do khả năng hoạt động tình dục và số lượng bạn tình của gái mại dâm khi mang thai giảm hơn so với nhóm gái mại dâm không mang thai.

Trong nhóm gái mại dâm tham gia nghiên cứu, có tới 14,6% gái mại dâm không sử dụng bất kỳ một biện pháp tránh thai nào và 62,2% gái mại dâm áp dụng biện pháp tránh thai bằng bao cao su trong đó, chỉ có 37,5% sử dụng bao cao su thường xuyên (Bảng 3.2). Như vậy, đa số đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng có hành vi tình dục không an toàn và là nguồn mang, nguồn lây truyền các bệnh lây truyền qua đường tình dục, bao gồm cả HPV. Việc tuyên truyền xã hội học và các chương trình giám sát trọng điểm cho nhóm đối tượng gái mại dâm là hành động cần thiết nhằm kiểm soát tình trạng tăng các bệnh lây truyền qua đường tình dục trong cộng đồng.

Việc sử dụng bao cao su cho các hành vi tình dục an toàn là yếu tố góp phần giảm nguy cơ lây nhiễm HPV. Các hành vi tình dục đồng giới là một trong những nguyên nhân làm tăng khả năng lây nhiễm các bệnh lây truyền tình dục, đặc biệt là lây nhiễm HIV và HPV [77].

So sánh với kết quả nghiên cứu về tần xuất sử dụng bao cao su thường xuyên của đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng với tần xuất sử dụng bao cao su của đối tượng gái mại dâm tại một số quốc gia lân cận như Hồng Kông, Philippine và Indonesia cho thấy, việc áp dụng biện pháp tình dục an toàn sử dụng bao cao su của gái mại dâm tại Hải Phòng tương đồng với gái mại dâm tại Indonesia (16 - 38%) nhưng thấp hơn rõ rệt so với gái mại dâm Hồng Kông (95%), Philippine (63,2%) [77], [78], [79].

4.1.2.3. Mối liên quan của các bệnh lây truyền qua đường tình dục đến tỷ lệ nhiễm HPV ở gái mại dâm tại Hải Phòng

Theo Tổ chức Y tế thế giới WHO về chương trình giám sát các bệnh lây truyền qua đường tình dục ở gái mại dâm năm 2012, nhiễm trùng qua đường tình dục là những bệnh nhiễm trùng lây truyền từ người sang người thông qua hoạt động tình dục. Tác nhân lây truyền qua đường tình dục rất đa dạng, có thể là vi khuẩn, vi rút, nấm...trong đó các tác nhân như HIV, HPV, HBV, *N. gonorrhoeae* và *C.trachomatis* là những tác nhân thường gặp nhất, đặc biệt ở những người có hành vi tình dục “nguy cơ cao” [20], [80].

Theo WHO và UNAIDS, đến năm 2008, trên toàn thế giới đã có khoảng 498,9 triệu người nhiễm *T.vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *Syphilis*, khoảng 40,3 triệu người nhiễm HIV và khoảng 25 triệu bệnh nhân tử vong do AIDS. HIV/AIDS hiện đang xếp hàng thứ 3 trong các nguyên nhân gây tử vong (chiếm 7,5%) ở các nước đang phát triển [80], [81]. Trong đó, Đông Âu và Đông Nam Á là hai khu vực có tỷ lệ lây nhiễm HIV cao thông qua con đường tiêm chích ma túy. Việt Nam hiện đang được xếp vào danh sách các nước

có tỷ lệ nhiễm HIV cao trên thế giới cũng như trong khu vực. Theo Bộ Y tế Việt Nam, nước ta có số lượng người nhiễm HIV cao thứ 6 ở Châu Á [82].

Các nhiễm trùng qua đường tình dục dù có hay không có tổn thương đường sinh dục cũng là nguy cơ cho sự lây truyền HIV, do đó việc quản lý các bệnh lây truyền qua đường tình dục là một mắt xích quan trọng trong công tác phòng chống HIV/AIDS đặc biệt trên các đối tượng đối tượng tiêm chích ma túy và gái mại dâm, nhóm đối tượng góp phần không nhỏ làm lây lan đại dịch HIV/AIDS cũng như làm tăng tỷ lệ các bệnh lây truyền qua đường tình dục.

HPV và HIV là hai tác nhân lây truyền qua đường tình dục phổ biến và là gánh nặng bệnh tật trên toàn thế giới, đặc biệt ở những nước đang phát triển, nơi có tỷ lệ nhiễm HIV cao và khả năng bao phủ của vắc xin phòng chống HPV còn kém hiệu quả. Sự kết hợp của hai tác nhân này đã đưa ra những thách thức lớn trong công tác bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

HPV có thể được phát hiện ở 10 - 40% phụ nữ không có bất thường về tế bào cổ tử cung và đa số các trường hợp chỉ nhiễm HPV thoáng qua trong một thời gian ngắn, vì đáp ứng miễn dịch của cơ thể có thể nhanh chóng loại bỏ hoàn toàn HPV trong 6 tháng đầu sau nhiễm, 91% trường hợp loại bỏ hoàn toàn HPV trong năm đầu tiên và 70% trong năm thứ hai. Khoảng 10% HPV thoát khỏi đáp ứng miễn dịch của cơ thể chủ, tồn tại dai dẳng đến độ tuổi trung niên nhưng là nguyên nhân gây biến đổi tế bào, hình thành các khối u ác tính. Tuy nhiên, ở những bệnh nhân có đồng nhiễm HIV thì tình trạng suy giảm miễn dịch do HIV gây ra sẽ là cơ hội thuận lợi cho HPV xâm nhập và tồn tại dai dẳng. Các đáp ứng miễn dịch dịch thể (IgA, IgG) và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thải loại HPV giảm trầm trọng ở giai đoạn HIV nhiễm mới. Đặc biệt sự suy giảm miễn dịch sẽ nặng nề hơn ở những bệnh nhân hút thuốc lá [83]

Đánh giá mối liên quan giữa tình trạng nhiễm HPV và HIV tại Việt Nam, tác giả Nguyễn Vương và cộng sự [36] phân tích 3 vấn đề cần chú ý đó là: (1) Tại Việt Nam, số trường hợp tử vong do HIV/AIDS thấp hơn rất nhiều so với số trường hợp tử vong do HPV. Theo Cục phòng chống AIDS Bộ Y tế, tính đến 30.11.2013, toàn quốc đã có 216.254 người nhiễm HIV và mỗi năm có khoảng 663 trường hợp tử vong do AIDS [82]. Chỉ tính riêng UTCTC, mỗi năm Việt Nam có khoảng 6000 ca nhiễm mới và tử vong khoảng 3000 trường hợp [1]; (2) HPV cũng là bệnh lây truyền qua đường tình dục như HIV và là nguyên nhân của nhiều bệnh lý ác tính nhưng sự quan tâm về HPV còn chưa nhiều, do đó các chiến lược phòng chống HPV chưa đạt hiệu quả cao; (3) HIV có thể phòng tránh lây nhiễm nhưng chưa có thuốc điều trị đặc hiệu triệt để. Ngược lại, các bệnh ác tính do HPV có thể điều trị hiệu quả, khỏi hoàn toàn nếu được chẩn đoán, phát hiện sớm. Với những ý nghĩa trên, việc đánh giá về tầm quan trọng và tính đa dạng của bệnh lý học HPV tại Việt Nam cần được đặc biệt quan tâm hơn [36].

Kết quả bảng 3.3 khảo sát tỷ lệ nhiễm các bệnh lây truyền qua đường tình dục cho thấy 30,3% gái mại dâm tại Hải Phòng nhiễm ít nhất 1 bệnh lây truyền qua đường tình dục. Tỷ lệ nhiễm HIV được xác định ở 9,8% trường hợp và đa số trường hợp nhiễm HIV có đồng nhiễm HPV (80,9%). Kết quả phân tích đơn biến và phân tích hồi quy đa biến hàm Stepwise (Bảng 3.3 và Bảng 3.4) chứng tỏ tình trạng nhiễm HPV liên quan chặt chẽ với tình trạng nhiễm HIV và HIV là yếu tố tác động độc lập tới nguy cơ nhiễm HPV. Có sự khác biệt rõ rệt về tỷ lệ nhiễm HPV trên nhóm nhiễm và không nhiễm HIV, trong đó nhóm gái mại dâm nhiễm HIV có nguy cơ nhiễm HPV cao gấp 7,9 lần ($p < 0,0001$).

Theo UNAIDS, tỷ lệ nhiễm HIV ở đối tượng gái mại dâm tại Việt Nam là 5,6% (năm 2005) và 7,2% (năm 2006). Tình trạng nhiễm HIV trên đối

tượng gái mại dâm tại Việt Nam chủ yếu gặp ở đối tượng gái mại dâm có tiêm chích ma túy, có khoảng 30% gái mại dâm thường xuyên tiêm chích ma túy [84], [85]. Như vậy, tỷ lệ tiêm chích ma túy ở gái mại dâm tại Hải Phòng (18,4% - Bảng 3.1.) thấp hơn so với tỷ lệ tiêm chích ma túy của gái mại dâm trên toàn quốc nhưng tỷ lệ nhiễm HIV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng (9,8%) cao hơn so với kết quả báo cáo trên. Điều này có ý nghĩa gợi ý, đường lây truyền HIV ở đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng không đơn thuần qua đường tiêm chích ma túy mà lây truyền chủ yếu qua hành vi tình dục không an toàn, không sử dụng bao cao su thường xuyên.

Cùng với HIV, *C.trachomatis* cũng là một trong những tác nhân lây truyền qua đường tình dục phổ biến và được đánh giá là yếu tố đồng nhiễm trong con đường lây truyền HPV. Tỷ lệ nhiễm *C.trachomatis* trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng là 5,4%, thấp hơn so với tỷ lệ nhiễm *C.trachomatis* trên đối tượng gái mại dâm ở một số nước trên thế giới như Hàn Quốc (12,8%), tỉnh Vân Nam Trung Quốc (26,0%), Philippine (28,0%) và Nhật Bản (13,0%) nhưng có tới 73,1% gái mại dâm tại Hải Phòng đồng nhiễm HPV và *C.trachomatis* [77], [78], [79], [86]. Mối liên quan chặt chẽ của *C.trachomatis* và HPV trong nghiên cứu này cũng tương đồng với các kết quả nghiên cứu đã công bố trước, nhóm gái mại dâm nhiễm *C.trachomatis* có nguy cơ nhiễm HPV cao gấp 2,7 lần so với nhóm không nhiễm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p=0,027$ (Bảng 3.3), tuy nhiên kết quả phân tích đa biến ở bảng 3.4 cho thấy *C.trachomatis* là không phải yếu tố tác động độc lập tới nguy cơ nhiễm HPV.

Tỷ lệ nhiễm *N.gonorrhoeae* được xác định trên 1,5% đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng, kết quả này tương đồng với tỷ lệ nhiễm *N.gonorrhoeae* trên đối tượng gái mại dâm tại Hồng Kông là 1,8% nhưng thấp hơn rõ rệt so với đối tượng gái mại dâm tại Indonesia (15,8 – 43,9%) và Nhật Bản (4,1%) [42], [78], [87]. Mặc dù *N.gonorrhoeae* và *C.trachomatis* đều là vi khuẩn

Gram âm lây truyền qua đường tình dục nhưng nguy cơ nhiễm HPV không có sự khác biệt giữa nhóm nhiễm và nhóm không nhiễm *N.gonorrhoeae*. Các nghiên cứu trước đánh giá mối liên quan giữa HPV và *N.gonorrhoeae* cũng cho kết quả tương tự [42], [78]. Sự khác biệt về nguy cơ gây nhiễm HPV của *N.gonorrhoeae* và *C.trachomatis* có thể do sự khác biệt về cấu trúc sinh học của hai loại vi khuẩn này. *C.trachomatis* là vi khuẩn Gram âm nhưng có chu trình sống lại tương tự như vi rút, không có khả năng tự tổng hợp ATP và hoàn toàn phụ thuộc vào chu trình sống của tế bào chủ. Ngược lại, song cầu khuẩn Gram âm *N.gonorrhoeae* có thể tự tổng hợp ATP cho hoạt động sống, hoàn toàn độc lập và không phụ thuộc tế bào.

Theo báo cáo thống kê của WHO, mỗi năm trên thế giới có khoảng 520.000 người nhiễm và gần một triệu ca tử vong do HBV, khoảng 200 triệu trường hợp nhiễm HCV và là nguyên nhân của 50 đến 75% ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh đứng hàng thứ sáu về tỉ lệ tử vong do ung thư. Tỷ lệ lưu hành HBsAg toàn cầu chia làm 3 nhóm: nhóm các nước có tỷ lệ nhiễm cao ($\geq 8\%$); nhóm các nước có tỷ lệ nhiễm trung bình (2-7%) và nhóm các nước có tỷ lệ nhiễm thấp ($< 2\%$). Việt Nam là một trong những nước có tỷ lệ nhiễm HBV cao nhất thế giới (15%-20%) với khoảng 10 -14 triệu người nhiễm [80]. Như vậy, tỷ lệ nhiễm HBV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng trong nghiên cứu này (6,9%) thấp hơn so với tỷ lệ nhiễm HBV trên đối tượng gái mại dâm đã công bố trước đây. Theo Nguyễn Hùng Cường và cộng sự, tỷ lệ nhiễm HBV trên đối tượng gái mại dâm không nhiễm HIV là 12,3% và trên đối tượng gái mại dâm nhiễm HIV là 51,6% [89].

Theo kết quả bảng 3.3, tình trạng nhiễm HCV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng chiếm tỷ lệ cao nhất (14,6%). Kết quả báo cáo trong nghiên cứu này thấp hơn kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác: Linda và Cs báo cáo năm 2012 về tỷ lệ nhiễm HCV ở Hải Phòng, Hà Nội, Đà Nẵng,

Khánh Hòa và Cần Thơ cho thấy tỷ lệ nhiễm HCV trên đối tượng tiêm chích ma túy và gái mại dâm là 32,15%; của Dorothy và cộng sự về tỷ lệ nhiễm HCV tại Philippine là 28,11%; Tatjana và cộng sự báo cáo tỷ lệ nhiễm HCV trên nhóm đối tượng "nguy cơ cao" tại Croatia là 73,1% [90], [91], [92]. Tuy nhiên, khi đánh giá mối liên quan giữa tình trạng nhiễm HCV, HBV với nguy cơ nhiễm HPV không thấy sự khác biệt thống kê giữa nhóm nhiễm và nhóm không nhiễm.

Sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm HCV do sự phân bố về tỷ lệ tiêm chích ma túy khác nhau ở các khu vực địa lý. Những nghiên cứu trước đây đã chỉ ra sự lây nhiễm nhanh chóng HCV trên đối tượng tiêm chích ma túy, đặc biệt ngay sau những lần tiêm chích đầu tiên, hơn 90% đối tượng tiêm chích ma túy nhiễm HCV mạn tính. Tình trạng nhiễm dai dẳng HCV trên nhóm đối tượng này là nguồn lây truyền chính HCV trong cộng đồng [90], [93].

4.2. Sự phân bố genotype HPV ở gái mại dâm tại Hải Phòng

4.2.1. Xác định genotype HPV bằng phương pháp DNA microarray và phương pháp giải trình tự sau tách dòng

4.2.1.1. Xác định genotype HPV bằng phương pháp DNA microarray

Có rất nhiều loại kit dựa trên các phương pháp khác nhau được ứng dụng để phát hiện DNA HPV và xác định genotype HPV. Tuy nhiên, độ nhạy và độ đặc hiệu của từng loại kit không giống nhau, đây là một trong những nguyên nhân dẫn đến các kết quả khác nhau về tỷ lệ nhiễm và sự phân bố genotype HPV giữa các khu vực [94]. Vì vậy, việc lựa chọn kit sử dụng trong nghiên cứu cũng là vấn đề cần được quan tâm.

Cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ, kỹ thuật sinh học phân tử hiện đang là phương pháp hữu hiệu trong chẩn đoán ứng dụng, trong đó công nghệ sử dụng DNA chip (phương pháp DNA microarray) hiện đang là

phương pháp tiên tiến được ứng dụng hiệu quả nhất. Phương pháp DNA microarray ứng dụng trong xác định genotype HPV không chỉ có giá trị cao trong việc phát hiện đồng thời một số lượng lớn genotype HPV riêng biệt mà còn có khả năng phát hiện đa nhiễm các genotype HPV với độ nhạy của kỹ thuật đạt 94,9% [95]. Hơn nữa, DNA microarray còn được sử dụng nhằm đánh giá những thay đổi trong mức độ biểu hiện gen như các biểu hiện đơn, đa hình thái hoặc các trình tự đột biến trên gen. Theo kết quả của tác giả Jones nghiên cứu so sánh giữa phương pháp DNA microarray với phương pháp lai bắt giữ 2 và với phương pháp PCR enzym miễn dịch sử dụng môi GP5+/GP6+ cho thấy phương pháp DNA microarray có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn so với hai phương pháp trên [96].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn GeneSquare assay Kit (Kurabo, Osaka, Japan) để xác định genotype HPV dựa trên kỹ thuật DNA microarray. Chất lượng của GeneSquare assay Kit đã được kiểm tra và so sánh với hai loại kit phổ biến khác như Digene Hybrid Capture II Assay (Valencia, CA) và Roche Linear Array HPV Genotyping Assay (Indianapolis, IN). Theo báo cáo của tác giả Ermel và cộng sự năm 2010, GeneSquare assay Kit có độ nhạy và độ đặc hiệu tương đồng với Roche Linear Array HPV Genotyping Assay, nhưng cao hơn so với Digene Hybrid Capture II Assay. Tuy nhiên, khi so sánh kết quả xác định genotype của Linear Array HPV Genotyping Assay và GeneSquare assay cho thấy, Linear Array HPV Genotyping Assay có thể xác định thiếu một số genotype mà GeneSquare assay có thể phát hiện được. Nguyên nhân là do môi Linear Array HPV Genotyping Assay không thể khuếch đại đoạn L1 HPV đã bị mất hoặc đứt gãy trong khi đó, môi sử dụng trong GeneSquare assay Kit được thiết kế đặc hiệu không có đoạn trùng lặp ở vùng khuếch đại, thay đổi từ 130 - 492 bp tùy theo từng genotype. Hơn nữa, GeneSquare assay Kit còn có khả năng phát

hiện HPV genotype 52 cao hơn so với Roche Linear Array HPV Genotyping Assay. Thời gian và cách tiến hành của loại kit chúng tôi lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu ngắn và dễ dàng hơn so với các loại kit khác [97].

Tiến hành lựa chọn DNA tổng số sau tách chiết từ những mẫu đã xác định HPV DNA dương tính (được phát hiện bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified) để xác định genotype HPV bằng GeneSquare assay Kit. Quy trình tiến hành theo đúng hướng dẫn của hãng sản xuất kit. Kết quả xác định genotype HPV bằng GeneSquare assay Kit trên máy scan cho hình ảnh huỳnh quang rõ ràng, sắc nét và không có hiện tượng lai chéo giữa các giếng (Hình 3.3. và 3.4.). Kết quả này phản ánh quy trình tiến hành xác định genotype HPV đã đạt chất lượng tốt.

Trong tổng số 246 mẫu HPV DNA dương tính khi phát hiện bằng phản ứng PCR có sử dụng cặp mồi GP5+/GP6+ original và 245 mẫu HPV DNA dương tính khi phát hiện bằng phản ứng PCR có sử dụng cặp mồi GP5+/GP6+ modified, chúng tôi đã xác định được genotype HPV của 229 mẫu (93,1%) và 17 mẫu không xác định được genotype HPV. Những mẫu không xác định được genotype HPV bằng GeneSquare assay Kit được tiếp tục xác định genotype bằng phương pháp giải trình tự gen sau tách dòng.

Theo kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả Albrecht, khả năng xác định genotype HPV trên 57 mẫu mô UTCTC đã xác định HPV DNA dương tính với mồi GPMY09/GPMY11 bằng phương pháp DNA microarray (Corning® UltraGAPS™ Coated Slides Kit) là 93.0%. Như vậy, khi so sánh khả năng xác định genotype HPV bằng phương pháp DNA microarray từ những mẫu HPV DNA dương tính với mồi GP5+/GP6+ original và mồi GP5+/GP6+ modified của GeneSquare assay Kit sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả trên.

4.1.2.2. Xác định genotype HPV bằng phương pháp giải trình tự sau tách dòng

Để tiến hành xác định genotype HPV từ những mẫu có HPV DNA dương tính với mỗi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified nhưng chưa xác định được genotype bằng kỹ thuật DNA microarray, chúng tôi tiến hành dòng hóa sản phẩm PCR với mục đích tăng số lượng DNA từ sản phẩm PCR và để chọn lọc những sản phẩm DNA đích đảm bảo chất lượng. Sau dòng hóa, những DNA plasmid tinh sạch sẽ được chọn lọc để xác định trình tự nucleotide.

Trong một số nghiên cứu trước, genotype HPV thường được xác định bằng phương pháp lai trực tiếp với các mẫu dò oligonucleotid đặc hiệu hoặc bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp sản phẩm khuếch đại DNA HPV sau phản ứng PCR. Mặc dù, những phương pháp này tiến hành nhanh chóng, thuận tiện nhưng hạn chế trong việc nhận định và phân tích kết quả xác định genotype HPV. Phương pháp giải trình tự gen trực tiếp sẽ hạn chế xác định trường hợp đa nhiễm genotype HPV và phương pháp lai trực tiếp chỉ xác định được một số lượng hạn chế các genotype HPV đã được gắn sẵn oligonucleotid. Hơn nữa, phương pháp lai trực tiếp còn có thể xảy ra hiện tượng lai chéo giữa các mẫu dò oligonucleotid với các sản phẩm DNA HPV đứt gãy hoặc khuếch đại không đặc hiệu [98]. Ngược lại, phương pháp giải trình tự gen sau tách dòng không chỉ xác định được các mẫu đa nhiễm genotype mà còn xác định riêng biệt từng genotype HPV.

Trình tự nucleotide trong mẫu nghiên cứu của chúng tôi được xác định rõ ràng, không có hiện tượng chồng lặp các nucleotide. Khi so sánh những trình tự thu được với trình tự gen L1 trên Ngân hàng gen Quốc tế nhằm xác định genotype HPV, chúng tôi nhận thấy các genotype HPV trong mẫu nghiên cứu của chúng tôi có độ tương đồng cao với các trình tự đã công bố.

Trên tổng số 17 mẫu giải trình tự nucleotide sau tách dòng, chúng tôi xác định được 7 genotype HPV khác nhau khác nhau của 16 mẫu và 1 mẫu đã xác định được trình tự đoạn gen 140 bp khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng mỗi GP5+/GP6+ original không phải là HPV DNA. Với kết quả này, có thể nhận xét rằng, mỗi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified mà chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Tuy nhiên, mỗi GP5+/GP6+ original có thể gây bắt cặp nhầm và việc sử dụng mỗi GP5+/GP6+ modified bổ xung nhằm xác định tỷ lệ nhiễm HPV trong nghiên cứu là hợp lý.

Theo tác giả de Roda Husman, mỗi GP5+/GP6+ original được sử dụng trong nghiên cứu này có độ nhạy rất cao, có khả năng phát hiện được ít nhất 27 genotype HPV khác nhau và đã được xác định là cặp mỗi có khả năng khuếch đại 100% DNA HPV đích trên bệnh nhân UTCTC [59]. Do đó, có thể sử dụng mỗi GP5+/GP6+ original trong sàng lọc DNA HPV. Tuy nhiên, khi so sánh độ nhạy và độ đặc hiệu của GP5+/GP6+ original với kỹ thuật đánh dấu phóng xạ mẫu dò phát hiện HPV bằng kỹ thuật ELISA cho thấy phản ứng PCR sử dụng mỗi GP5+/GP6+ original có độ nhạy cao nhưng sản phẩm PCR đôi khi có xuất hiện sản phẩm phụ và hạn chế khả năng phát hiện một số genotype HPV khác như HPV-39 và HPV-52 [59].

Để khắc phục nhược điểm của mỗi GP5+/GP6+ original, nhóm nghiên cứu chúng tôi tiến hành thiết kế mỗi GP5+/GP6+ modified dựa trên trình tự nucleotide mỗi GP5+/GP6+ original nhằm khuếch đại 140 bp của DNA đích nằm trên vùng gen L1, vùng gen bảo tồn và ổn định nhất trong bộ gen của HPV. Mỗi GP5+/GP6+ modifile gồm 3 cặp mỗi khác nhau được đánh dấu gồm GP5+M1-2; GP5+M2-2; GP5+M3-2 và GP6+M1-2; GP6+M2-2; GP6+M3. Chiều dài và trình tự các nucleotide mỗi được trình bày cụ thể trong bảng 2.1.

chương 2. Đồng thời, độ đặc hiệu của mỗi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified đã được nhóm nghiên cứu công bố năm 2009 bởi tác giả Miyashita [17].

100% các genotype HPV được phát hiện bằng phương pháp giải trình tự sau tách dòng là các genotype HPV “nguy cơ thấp” hoặc “chưa xác định nguy cơ” không có trình tự oligonucleotide trên mẫu dò của Kit GeneSquare HPV Typing DNA microarray. Trình tự oligonucleotide gắn trên mẫu dò chỉ gồm những trình tự DNA bổ xung với đoạn gen L1 HPV của 15 genotype “nguy cơ cao” và 8 genotype “nguy cơ thấp” thường gặp nhất. Như vậy, phương pháp giải trình tự gen sử dụng trong nghiên cứu là phương pháp thích hợp nhằm xác định bổ xung các genotype HPV chưa có oligonucleotide lai trên mẫu dò và giúp phát hiện các biến thể mới của genotype.

4.2.2. Sự phân bố và tình trạng đơn đa nhiễm genotype HPV

4.2.2.1. Sự phân bố genotype HPV

HPV là một trong những vi rút có nhiều genotype nhất với khoảng 200 genotype khác nhau được biết đến nhưng mới xác định trình tự của khoảng 100 genotype, trong đó có khoảng 40 genotype có thể lây truyền qua đường tình dục. HPV 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35 là tám type “nguy cơ cao” thường gặp nhất chiếm tới 90% các trường hợp UTCTC, riêng HPV 16 và HPV 18 đã gặp ở 70% trường hợp [16], [60]. Trong tổng số 291 triệu phụ nữ trên toàn thế giới nhiễm HPV, có khoảng 105 triệu trường hợp nhiễm type HPV “nguy cơ cao” 16, 18 [16].

Hiện nay, vắc xin đặc hiệu type 16, 18 đã góp phần đáng kể trong công tác phòng chống gánh nặng bệnh tật do UTCTC gây ra cho cộng đồng. Tuy nhiên, khả năng bảo vệ chéo giữa các type HPV của vắc xin rất thấp, dưới 1% trong khi đó, sự phân bố genotype HPV thay đổi theo từng vùng địa lý và sắc tộc khác nhau do có sự tương tác giữa các type và các biến thể với đáp ứng miễn dịch trong tế bào vật chủ [99]. Do đó, việc phát hiện DNA HPV và đánh

giá sự phân bố genotype HPV không chỉ có ý nghĩa giúp cho chương trình triển khai vắc xin hiệu quả mà còn có ý nghĩa thiết thực trong việc quản lý, theo dõi, phòng ngừa sớm UTCTC cho đối tượng nhiễm HPV.

Từ 246 mẫu HPV DNA dương tính khi khuếch đại bằng phản ứng PCR với môi GP5+/GP6+ original và 245 mẫu HPV DNA dương tính khi khuếch đại bằng phản ứng PCR với môi GP5+/GP6+ modified, chúng tôi tiến hành xác định genotype HPV bằng phương pháp DNA microarray và bằng phương pháp giải trình tự gen sau tách dòng. Kết quả nghiên cứu đã xác định được 33 genotype từ 630 chủng HPV khác nhau, trong đó, các genotype HPV “nguy cơ cao” chiếm đa số (75,87%), genotype “nguy cơ thấp” chiếm 16,5% và genotype “chưa xác định nguy cơ” chiếm 7,63%.

Tình trạng lưu hành các genotype nhóm “nguy cơ cao” phổ biến hơn các genotype thuộc nhóm “nguy cơ thấp” có lẽ vì những genotype “nguy cơ cao” thường khó bị loại bỏ khỏi cơ thể và được tồn tại dai dẳng hơn so với các genotype “nguy cơ thấp” đặc biệt là HPV [16].

Với 33 genotype HPV được xác định từ 479 gái mại dâm tại Hải Phòng trong nghiên cứu, chúng tôi xác định sự phân bố của HPV 52 là genotype chiếm tỷ lệ cao nhất (13,33%), tiếp đến là HPV 16 (12,53%) và HPV 58 chiếm 8,09%. HPV 18 chiếm 6,5% tổng số genotype HPV xác định được.

Theo kết quả báo cáo tổng hợp của de Sanjose và cộng sự năm 2007 về sự phân bố genotype HPV ở phụ nữ có tế bào học cổ tử cung bình thường trên toàn thế giới, HPV 16, HPV18, HPV 31 và HPV 52 là những genotype thường gặp nhất chiếm 50% số người nhiễm HPV với tỷ lệ lần lượt là 2,5%; 0,9%; 0,7%; 0,6% và 0,6%. Nghiên cứu tổng hợp từ 194 nghiên cứu khác nhau về sự phân bố genotype HPV trên 1.016.719 phụ nữ trên khắp thế giới, tác giả Bruni và cộng sự công bố tỷ lệ nhiễm HPV tương tự như nghiên cứu trước

trong đó HPV 16 (3,2%), HPV 18 (1,4%), HPV 52 (0,9%), HPV 31 (0,8%) và HPV 58 (0,7%) [16], [61].

Tuy nhiên, genotype HPV phân bố không giống nhau giữa các khu vực. Ở châu Âu và châu Mỹ, HPV 16 và HPV 18 là hai genotype thường gặp nhất, tiếp đến là HPV 31 và HPV 33. Ở phía Nam sa mạc Sahara, Châu Phi, HPV 45 là genotype chiếm tỷ lệ cao nhất [16]. Trong khi đó, tại một số nước châu Á như Nhật Bản, Philippine, Đài Loan và tỉnh Chiết Giang phía Nam Trung Quốc, HPV 52 và HPV 58 lại là hai genotype thường gặp nhất [15] [18], [17], [42]. Như vậy, kết quả xác định sự phân bố genotype HPV trong nghiên cứu này cũng cho thấy sự phân bố genotype HPV thay đổi theo từng vùng địa lý và sự phân bố genotype HPV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng tương đồng với sự phân bố genotype HPV tại các tỉnh phía Nam Trung Quốc và với một số nước lân cận tại châu Á.

So sánh với một số kết quả nghiên cứu về sự phân bố genotype HPV tại Việt Nam cho thấy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi có sự khác biệt với kết quả xác định sự phân bố genotype HPV bằng phương pháp PCR sử dụng mồi GP5+/GP6+ original và bằng phương pháp enzyme miễn dịch (enzyme immunoassay) của tác giả Phạm Thị Hoàng Anh và cộng sự năm 2003, nghiên cứu trên 994 phụ nữ độ tuổi từ 15 đến 65 tại khu vực Miền Bắc và 922 phụ nữ tại Thành phố Hồ Chí Minh Miền Nam Việt Nam xác định HPV 16 là genotype chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là HPV 58, 18 và HPV 56 [66]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với kết quả nghiên cứu của tác giả Hernadez năm 2008, nghiên cứu xác định sự phân bố genotype HPV trên 282 gái mại dâm tại tỉnh Sóc Trăng, miền Nam Việt Nam bằng phương pháp Reverse line blot detection sử dụng sản phẩm PCR khuếch đại bằng mồi GPMY09/GPMY11 (Roche Molecular Systems), kết quả báo cáo HPV 52 là genotype phổ biến nhất. Sự khác biệt về kết quả nghiên cứu sự

phân bố genotype HPV trên cùng khu vực địa lý có thể do việc sử dụng các phương pháp khác nhau trong nghiên cứu.

Trong các nghiên cứu trước, cặp mồi được sử dụng nhiều nhất là GPMY09/GPMY11 khuếch đại 450 bp trên đoạn L1 ORF và cặp mồi GP5+/GP6+original khuếch đại 140 bp vùng L1. Hai loại mồi đều có độ nhạy cao, có thể khuếch đại từ 10-200 bản copy DNA, tuy nhiên, nhược điểm của cả hai loại mồi GPMY09/GPMY11 và GP5+/GP6+ original đều có nhiệt độ bắt cặp thấp có thể gây khuếch đại những mẫu DNA đứt gãy hoặc DNA không đặc hiệu DNA đích [100]. GPMY09/GPMY11 có thể xác định sai lệch 7% UTCTC do sự vắng mặt của HPV DNA trong tế bào ung thư (DNA HPV đã bị đứt gãy và làm mất vùng L1 ORF trong tế bào ung thư) [101].

Hiện nay, trên thế giới có hai loại vắc xin phòng chống HPV được sử dụng phổ biến là Gardasil[®] (đặc hiệu HPV type 6,11,16,18; sử dụng cho nữ 9-26 tuổi và cho nam 11-26 tuổi chưa từng quan hệ tình dục) và Cervarix[®] (đặc hiệu HPV type 16,18; sử dụng cho nữ từ 10 đến 45 tuổi). Vắc xin HPV là các hạt vi rút có cấu trúc giống HPV nhưng không có DNA HPV mà chỉ có vỏ capsid với các kháng nguyên L1, L2 trên bề mặt (virus-particles, VLPs).

Có rất nhiều câu hỏi khác nhau hướng tới vai trò của vắc xin đối với nhóm phụ nữ trẻ trong cộng đồng. Khi so sánh khả năng sinh kháng thể của vắc xin HPV với đáp ứng miễn dịch tự nhiên của cơ thể sau nhiễm HPV cho thấy, việc tiêm phòng HPV bằng vắc xin giúp cơ thể có miễn dịch sinh kháng thể mạnh mẽ gấp 50 lần so với đáp ứng miễn dịch tự nhiên [102]. Theo kết quả nghiên cứu đánh giá hiệu quả của vắc xin phòng nhiễm HPV trên 8093 phụ nữ trẻ độ tuổi từ 15-25 sau 6 tháng tiêm phòng của tác giả Paavonen và cộng sự năm 2009 cho thấy, hiệu quả phòng nhiễm HPV 16/18 đạt 92,9% , Cervarix kích thích cơ thể sinh đáp ứng mạnh hơn so với Gardasil và việc tiêm phòng vắc xin cho nhóm phụ nữ trẻ tuổi có vai trò giảm nguy cơ

UTCTC trong 4 năm sau đó. Gardasil có khả năng bảo vệ cơ thể khỏi HPV 16 trong 8,5 năm sau tiêm phòng [103]. Theo kết quả nghiên cứu tổng hợp từ 79 nghiên cứu khác nhau của Bao và cộng sự năm 2008 về sự phân bố genotype HPV nhằm đánh giá hiệu quả vắc xin phòng chống HPV 16/18 trên 16,803 phụ nữ châu Á có xét nghiệm tế bào học cổ tử cung bình thường và 8350 phụ nữ mắc UTCTC cho thấy, vắc xin phòng nhiễm HPV 16/18 có thể bao phủ được khoảng 70% khu vực châu Á. Tuy nhiên, HPV 52 và HPV 58 là hai genotype chiếm tỷ lệ cao nhất ở khu vực Đông Á và Đông Nam Á [14]. Như vậy, kết quả sự phân bố genotype HPV trong nghiên cứu của chúng tôi phản ánh sự tương đồng với kết quả nghiên cứu trên và việc triển khai vắc xin thế hệ hai (second-generation HPV prophylactic vaccine) phòng chống HPV 16, 52, 58, 18 ở khu vực Đông Nam Á nói chung và tại Việt Nam nói riêng có ý nghĩa quan trọng trong phòng tránh UTCTC cho cộng đồng, đồng thời, việc phát hiện các genotype HPV nhóm “nguy cơ cao” gồm HPV 16, 18, 58, 52 được coi như chiến lược toàn diện trong việc triển khai vắc xin phòng chống HPV.

4.2.2.2. Tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV

HPV genotype “nguy cơ cao” là tác nhân cần thiết gây biến đổi tế bào, hình thành khối u ác tính, đặc biệt ở những trường hợp nhiễm dai dẳng kéo dài. Tuy nhiên, vai trò tác động của đa nhiễm genotype HPV với sự tăng sinh loạn sản tế bào vẫn còn là vấn đề chưa được đánh giá rõ ràng.

Tình trạng đa nhiễm genotype HPV thường gặp ở những người trẻ tuổi và những người bị suy giảm miễn dịch. Đa nhiễm với nhiều loại HPV là một phát hiện chung của nhiều nghiên cứu dịch tễ học phân tử, chiếm khoảng 20 – 50% tổng số các trường hợp nhiễm HPV và là cơ hội cho tình trạng nhiễm dai dẳng của các genotype HPV, đặc biệt các genotype “nguy cơ cao” [104]. Một số genotype HPV có thể tương tác hoặc phối hợp hiệu quả với các genotype

khác để kích thích phát triển những biến đổi tế bào, hình thành và tiến triển tổn thương.

Nguy cơ loạn sản mạnh mẽ và UTCTC xâm lấn dường như được tăng lên đáng kể ở những phụ nữ đa nhiễm nhiều genotype HPV so với những trường hợp đơn nhiễm một genotype HPV duy nhất [105]. Herrero và các cộng sự đã chỉ ra nguy cơ tổn thương nội biểu mô gai mức độ thấp tăng lên khi có hiện tượng đa nhiễm HPV 16 và các genotype khác [106]. Hơn nữa, Fife và cộng sự cho rằng những genotype HPV cùng loài sẽ có tương tác về đặc tính sinh học trên tế bào đích, HPV 51, 52, 56, và 58 là một trong những genotype có tác dụng hiệp đồng với HPV-16 gây loạn sản tế bào hoặc hình thành ung thư [107].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định tỷ lệ đa nhiễm trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng chiếm đa số (67,89%) trong đó, tất cả các trường hợp đa nhiễm đều nhiễm ít nhất một HPV genotype “nguy cơ cao”. Theo báo cáo của tổ chức Y tế thế giới về tình hình nhiễm HPV tại Việt Nam cho biết, tỷ lệ nhiễm chung trên toàn quốc chiếm 5,4% [1], trong đó có 41,6% số trường hợp đa nhiễm với ít nhất hai genotype HPV. Như vậy, Việt Nam có tỷ lệ nhiễm HPV thấp hơn so với tỷ lệ nhiễm chung ở các khu vực khác trên thế giới (10,1%) nhưng chủ yếu là đa nhiễm nhiều genotype HPV. Tình trạng đa nhiễm genotype HPV làm tăng nguy cơ nhiễm dai dẳng HPV gây biến đổi tế bào. Hơn nữa, các xét nghiệm phát hiện HPV DNA, xác định genotype HPV và chương trình sàng lọc UTCTC tại Việt Nam còn hạn chế [108], đây là một trong những nguyên nhân dẫn tới tỷ lệ mắc UTCTC ở Việt Nam cao nhất trong khu vực Đông Nam Á [109].

Tỷ lệ đa nhiễm genotype HPV trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với kết quả nghiên cứu của tác giả Spinillo A và cộng sự (32,6%); của tác giả Pista A (44,2%) và của Bosch F.X là 26,7%. Kết quả này có ý nghĩa gợi ý

cho chương trình sàng lọc phát hiện sớm tình trạng nhiễm HPV và tình trạng biến đổi tế bào học trên đối tượng gái mại dâm và trên các đối tượng phụ nữ trong cộng đồng tại khu vực Hải Phòng là rất cần thiết nhằm phát hiện sớm nguy cơ UTCTC [110], [111], [112].

4.2.2.3. Một số yếu tố liên quan đến tình trạng đơn - đa nhiễm genotype HPV

Để đánh giá mối liên quan của một số yếu tố tới tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng, chúng tôi tiến hành lựa chọn những yếu tố đã được phân tích mối liên quan có ý nghĩa thống kê với tình trạng nhiễm HPV trong nghiên cứu, bao gồm: lứa tuổi, tình trạng hôn nhân, tính trạng hút thuốc lá, tiền sử có thai, tình trạng nhiễm HIV và nhiễm *C. trachomatis*.

Yếu tố lứa tuổi liên quan có ý nghĩa mật thiết với tình trạng đa nhiễm genotype HPV ($p < 0,0001$) nhưng không liên quan tới tình trạng đơn nhiễm genotype HPV ($p = 0,807$). Trong tổng số 233 gái mại dâm dưới 25 tuổi, có 141 đối tượng nhiễm HPV trong đó có 43,3% gái mại dâm đa nhiễm genotype HPV. Tuy nhiên, khi phân tích sự liên quan của yếu tố tuổi với các loại đa nhiễm genotype HPV cho thấy yếu tố lứa tuổi chỉ liên quan chặt chẽ với loại đa nhiễm genotype "nguy cơ cao + nguy cơ thấp", đối tượng gái mại dâm dưới 25 tuổi có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao + nguy cơ thấp" gấp 3,1 lần so với đối tượng gái mại dâm trên 25 tuổi ($p < 0,0001$).

Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn tương đồng với các nghiên cứu trước, yếu tố lứa tuổi có sự liên quan đến tình trạng nhiễm HPV nói chung và tình trạng đa nhiễm genotype HPV nói riêng. Tình trạng đa nhiễm genotype HPV thường gặp hơn ở những phụ nữ trẻ tuổi và những đối tượng có hành vi hoạt động tình dục tích cực, đặc biệt ở những phụ nữ có tuổi quan hệ tình dục ban đầu sớm [110].

Tuổi quan hệ tình dục lần đầu và số lượng bạn tình là hai yếu tố nguy cơ chủ yếu liên quan đến nhau và đến tỷ lệ nhiễm HPV. Tuổi quan hệ tình dục lần đầu là yếu tố tiên lượng về số lượng bạn tình còn số lượng bạn tình lại là yếu tố nguy cơ gây nhiễm HPV. Greenberg và cộng sự cho rằng, những người có quan hệ tình dục sớm có tỷ lệ nhiễm HPV hơn nhóm quan hệ tình dục sau 18 tuổi vì nhóm có tuổi quan hệ tình dục lần đầu sớm có thường có hành vi tình dục tích cực và có tỷ lệ đồng nhiễm các bệnh lây truyền qua đường tình dục cao hơn. Ngoài ra, hành vi tình dục không an toàn cũng là nguyên nhân gây tăng tỷ lệ nhiễm HPV [113 [114].

Phân tích mối liên quan của tình trạng hôn nhân với tình trạng đơn – đa nhiễm genotype HPV, kết quả bảng 3.8 cho thấy tình trạng hôn nhân liên quan có ý nghĩa với tình trạng đa nhiễm genotype HPV nhưng không liên quan với tình trạng đơn nhiễm genotype HPV. Tình trạng gái mại dâm đã li dị, đang sống li thân hoặc góa chồng có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV cao hơn 1,6 lần so với nhóm đang chung sống với chồng hoặc bạn tình, và tình trạng gái mại dâm độc thân, chưa kết hôn có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao + nguy cơ thấp" cao gấp 3,7 lần so với nhóm đang chung sống với chồng hoặc bạn tình. Kết quả này gợi ý phản ánh số lượng bạn tình của nhóm đối tượng gái mại dâm độc thân, chưa kết hôn hoặc đối tượng gái mại dâm sống đơn thân cao hơn so với nhóm gái mại dâm đang chung sống với chồng hoặc bạn tình. Số lượng bạn tình là yếu tố nguy cơ quan trọng trong con đường lây truyền HPV. Nguy cơ nhiễm HPV ở nữ giới không chỉ phụ thuộc vào số lượng bạn tình mà còn phụ thuộc vào số lượng bạn tình của bạn tình. Sự lây truyền HPV có thể qua các hành vi tình dục trực tiếp hoặc không trực tiếp sẽ ngày càng lan rộng các nguy cơ trong cộng đồng. Hơn nữa, hành vi tình dục với nhiều bạn tình sẽ là nguy cơ cao lây nhiễm các tác nhân khác lây truyền qua đường tình dục và chính sự đồng nhiễm này lại là nguy cơ để

nhiễm mới HPV cũng như duy trì sự tồn tại dai dẳng HPV [108]. Tuy nhiên, hạn chế của đề tài chưa có các thông tin về số lượng bạn tình của gái mại dâm trên phiếu phỏng vấn, đa số gái mại dâm đều trả lời “không rõ” về số lượng bạn tình/ngày.

Tình trạng hút thuốc lá liên quan chặt chẽ là yếu tố liên quan tới nguy cơ mắc UTCTC và với tình trạng đa nhiễm genotype HPV. Tuy nhiên, nhóm đối tượng gái mại dâm hút thuốc lá trong nghiên cứu của chúng tôi có nguy cơ đa nhiễm genotype HPV thấp hơn so với nhóm không hút thuốc lá và ngược lại, nhóm gái mại dâm hút thuốc lá có nguy cơ nhiễm HPV cao hơn nhóm hút thuốc lá từ 1,4 - 3,6 lần trong đó, nguy cơ đa nhiễm genotype HPV "nguy cơ cao + nguy cơ thấp" cao gấp 2,1 lần so với nhóm hút thuốc lá. Kết quả này có lẽ do những đối tượng gái mại dâm hút thuốc lá có số lượng bạn tình thấp hơn với đối tượng gái mại dâm không hút thuốc lá. Có lẽ sự khác biệt về văn hóa, sắc tộc giữa các khu vực địa lý với việc hút thuốc lá cũng là nguyên nhân dẫn tới sự khác biệt về số lượng bạn tình của gái mại dâm.

Tiền sử có thai và sinh con nhiều lần là yếu tố nguy cơ của carcinoma *in situ* trên những phụ nữ đã nhiễm HPV. Đánh giá mối liên quan của tiền sử thai nghén với tình trạng đơn - đa nhiễm genotype HPV bằng phân tích đơn biến và hồi quy đa biến, kết quả cho thấy đối tượng gái mại dâm chưa có thai lần nào có nguy cơ nhiễm HPV cao gấp 1,7 lần so với nhóm đối tượng gái mại dâm đã có tiền sử thai nghén. Tuy nhiên, tiền sử thai nghén chỉ liên quan tới tình trạng đa nhiễm chung mà không liên quan có ý nghĩa tới từng loại đa nhiễm riêng. Kết quả nghiên cứu này dường như lần nữa ngược lại với các kết quả nghiên cứu trước đây cho rằng nguy cơ nhiễm HPV tỷ lệ thuận với tần xuất thai nghén [4], tuy nhiên, có lẽ do sự khác nhau đặc thù về quần thể nghiên cứu giữa nhóm đối tượng phụ nữ trong cộng đồng và đối tượng gái

mại dâm dẫn tới sự khác nhau về mối liên quan giữa các yếu tố dịch tễ tác động tới nguy cơ nhiễm HPV.

Mối liên quan giữa HIV và HPV là vấn đề được rất nhiều nghiên cứu quan tâm, đặc biệt trên đối tượng gái mại dâm, đối tượng có nguy cơ cao đồng nhiễm nhiều tác nhân lây truyền qua đường tình dục. Mối liên quan giữa HIV và HPV trong nghiên cứu này tương đồng với các kết quả nghiên cứu khác, tình trạng nhiễm HIV có liên quan chặt chẽ với cả tình trạng đơn nhiễm ($p=0,006$) và đa nhiễm genotype HPV ($p=0,037$). Sự suy giảm miễn dịch do HIV còn là cơ hội thuận lợi cho sự phát triển rối loạn thượng bì dạng hạt cơm, dạng bệnh lý phối hợp do tình trạng đồng nhiễm HIV và HPV [115].

Một tác nhân khác lây truyền qua đường tình dục cũng được biết đến với vai trò là yếu tố nguy cơ nhiễm HPV là *C.trachomatis*. Hai tác nhân cùng lây truyền qua đường tình dục đều có tỷ lệ nhiễm cao hơn ở nhóm tuổi dưới 25 và là những tác nhân có mối quan hệ mật thiết với UTCTC [116]. Kết quả phân tích đơn biến trong bảng 3.13 cho thấy những đối tượng gái mại dâm nhiễm *C.trachomatis* có liên quan với nguy cơ đa nhiễm genotype HPV mà không liên quan tới tình trạng đơn nhiễm genotype HPV.

Như vậy, qua kết quả phân tích mối liên quan của các yếu tố nguy cơ với tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng cho thấy, những yếu tố được xác định liên quan có ý nghĩa thống kê với nguy cơ nhiễm HPV đa số chỉ liên quan tới nguy cơ đa nhiễm genotype HPV, đặc biệt là mối liên quan với nguy cơ đa nhiễm genotype HPV “nguy cơ cao”. Kết quả phân tích trên gợi ý cho kế hoạch sàng lọc sớm những đối tượng có yếu tố nguy cơ nhằm giảm nguy cơ nhiễm mới HPV, nguy cơ đa nhiễm genotype HPV dẫn tới nhiễm dai dẳng HPV từ đó hình thành các khối u ác tính.

4.3. Môi liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và genotype HPV

4.3.1. Kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung trên gái mại dâm tại Hải Phòng

UTCTC là bệnh có thể gặp ở mọi lứa tuổi nhưng thường gặp nhất ở lứa tuổi 45-50. Vị trí ung thư thường xảy ra ở vùng ranh giới giữa biểu mô trụ và biểu mô lát ở cổ tử cung, gồm 75-80% là ung thư biểu mô vảy còn lại là ung thư biểu mô tuyến và dạng hỗn hợp. Quá trình tiến triển lâu dài, từ khi nhiễm HPV đến khi hình thành tổn thương ung thư có thể kéo dài từ 5 đến 25 năm [21].

Theo kết quả tổng kết của zur Hausen, người đã đoạt giải Nobel Y học năm 2008 với những nghiên cứu phát hiện về HPV, UTCTC là bệnh ác tính chiếm tới 12% tổng số các loại ung thư trên thế giới và là bệnh ung thư thường gặp nhất ở nữ, đứng hàng thứ 2 sau ung thư vú [117] trong đó khoảng 80% các trường hợp UTCTC xảy ra ở các nước đang phát triển [4]. Các type HPV “nguy cơ cao” là nguyên nhân của UTCTC gồm HPV16, 18, 45, 31, 33, 35, 51, 52.

Vai trò của HPV trong cơ chế gây UTCTC đã được bắt đầu nghiên cứu từ những năm cuối của thập kỷ 70. Năm 1976, Meisel-Fortin đã phát hiện HPV trong tế bào cổ tử cung biến đổi dạng không nhân Koilocyte và phân biệt sự khác nhau giữa hiện tượng tăng sinh dạng mụn cơm lành tính (dạng không phát triển thành ung thư) và dạng nhiễm HPV hình thành tế bào Koilocyte (có thể tiến triển thành tế bào ung thư). Nhóm nghiên cứu nhấn mạnh với kết luận, không nhiễm HPV sẽ không có khả năng tiến triển thành UTCTC và điều này có ý nghĩa xác định vai trò của HPV trong cơ chế gây tổn thương loạn sản cổ tử cung. Năm 1981, hai genotype đầu tiên là HPV 16 và HPV 18 được tìm thấy trên mô sinh thiết UTCTC bằng phương pháp tách dòng đã có ý nghĩa khẳng định vai trò của HPV trong loại bệnh lý ác tính này.

Năm 1985, Schwatz và cộng sự đã xây dựng thành công bộ gen HPV và đặt giả thuyết vai trò gây bất tử hóa tế bào cổ tử cung của gen E6, E7 HPV [118].

Theo thống kê của tổ chức Y tế thế giới năm 2010, ước tính mỗi năm, trên thế giới có khoảng 529.000 trường hợp mắc mới và khoảng 275.000 trường hợp tử vong do UTCTC trong đó, riêng châu Á đã chiếm 59,0% tổng số ca nhiễm mới [1].

Nhằm giảm tỷ lệ tử vong do UTCTC, việc triển khai những biện pháp phòng tránh lây nhiễm HPV là rất cần thiết. Đồng thời, cần tiến hành sàng lọc phát hiện sớm những biến đổi tế bào, các tổn thương tiền ung thư và theo dõi quá trình tiến triển bệnh bằng phương pháp tế bào học, soi cổ tử cung và phương pháp mô bệnh học cổ tử cung.

Phương pháp mô tế bào học cổ tử cung (xét nghiệm Pap smear) là phương pháp chẩn đoán tế bào học dựa vào tính chất bong ra một cách liên tục của tế bào âm đạo, cổ tử cung, đặc biệt là khả năng dễ bong và bong sớm của các tế bào ác tính. Dụng cụ lấy mẫu bệnh phẩm là một khâu kỹ thuật đầu tiên quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng và hiệu quả phát hiện bệnh. Sự ra đời của bàn chải tế bào “Cytobrush” vào năm 1987 đã giảm đáng kể tỷ lệ âm tính giả của xét nghiệm.

100% đối tượng gái mại dâm trong nghiên cứu này được khám sản phụ khoa và lấy mẫu xét nghiệm tế bào học. Kết quả xét nghiệm sàng lọc Pap smears xác định 70,6% mẫu có tế bào cổ tử cung bình thường, 75 (15,7%) trường hợp có tế bào biểu mô biến đổi lành tính do viêm, 44 (9,2%) trường hợp có các tế bào chuyển sản và 22 (4,5%) trường hợp có thay đổi bất thường của tế bào biểu mô cổ tử cung bao gồm 5 trường hợp có thay đổi tế bào biểu mô gai không điển hình ý nghĩa chưa xác định ASC-US, 2 trường hợp có thay đổi tế bào biểu mô gai không điển hình nhưng không loại trừ được tổn thương trong biểu mô mức độ cao ASC-H, 13 trường hợp có thay đổi tổn thương nội

biểu mô gai mức độ thấp LSIL, 2 trường hợp có thay đổi tổn thương nội biểu mô gai mức độ cao HSIL. Chưa phát hiện trường hợp ung thư biểu mô hoặc ung thư tế bào tuyến cổ tử cung trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng.

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới năm 2010, tỷ lệ UTCTC trên toàn thế giới trung bình là 15,8%, ở những nước công nghiệp phát triển là 12,1% và ở những nước đang phát triển là 16,7%, trong đó tỷ lệ UTCTC ở châu Á là 15,6%. Như vậy, tỷ lệ UTCTC trong nghiên cứu này thấp hơn rõ rệt có lẽ do độ tuổi của gái mại dâm tham gia nghiên cứu từ 12 đến 48 tuổi (trung bình: $27,4 \pm 7,4$ tuổi) và lứa tuổi mắc UTCTC thường ở độ tuổi trên 50 tuổi vì quá trình tiến triển thâm lạng từ khi nhiễm HPV tới ung thư có thể kéo dài từ 5 – 25 năm.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.15 thể hiện sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm HPV ở nhóm đối tượng gái mại dâm có kết quả tế bào học bình thường và nhóm có tế bào học bất thường. Ở nhóm kết quả xét nghiệm tế bào học cổ tử cung bình thường (các tế bào hình thái bình thường, tế bào biểu mô biến đổi lành tính do viêm, tế bào chuyển sản) có tỷ lệ HPV DNA âm tính và DNA HPV dương tính tương đương. Tuy nhiên, ở nhóm kết quả xét nghiệm tế bào học cổ tử cung bất thường (ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL) có tỷ lệ nhiễm HPV chiếm đa số. Kết quả này phản ánh rõ vai trò gây biến đổi tế bào học của HPV.

4.3.2. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và HPV

Để phân tích rõ hơn vai trò tác động của từng genotype HPV với tế bào cổ tử cung, chúng tôi tiến hành phân tích đơn biến đánh giá mối liên quan của các genotype HPV xác định được từ mẫu bệnh phẩm cổ tử cung. Kết quả bảng 3.16 cho thấy sự biến đổi tế bào cổ tử cung có liên quan chặt chẽ với tình trạng nhiễm HPV đường sinh dục. Đối tượng nhiễm HPV có kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung bất thường cao gấp 21,6 lần so với nhóm không nhiễm HPV, sự khác biệt có rất ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$.

Hơn nữa, những thay đổi bất thường của tế bào biểu mô cổ tử cung chỉ liên quan có ý nghĩa với những genotype HPV nhóm "nguy cơ cao" như HPV-16, HPV-39, HPV-51, HPV-52, HPV-53 và HPV-68. Không có sự khác biệt về biến đổi tế bào cổ tử cung trên đối tượng gái mại dâm nhiễm HPV-18 và không nhiễm HPV-18 ($p=0,710$). Nhưng có sự khác biệt rõ rệt về kết quả tế bào học giữa nhóm nhiễm và nhóm không nhiễm HPV-16 ($p<0,0001$), HPV-52 ($p=0,002$).

Khi so sánh sự biến đổi vùng gen E6/E7 của HPV 16 và HPV 52 lưu hành trong quần thể đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng với gen E6/E7 của HPV 16, HPV 52 ở Phillipine và Nhật Bản, hai quốc gia lân cận có sự tương đồng về phân bố genotype HPV cho thấy, các biến thể HPV-16 và HPV-52 không giống nhau giữa các nước dẫn tới sự khác biệt về vai trò tác động của các biến thể trên mô tế bào. Kết quả phân tích trên gợi ý tới chiến lược toàn diện cho chương trình triển khai vắc xin phòng chống HPV đặc hiệu cho các genotype lưu hành theo khu vực và chương trình sàng lọc sớm UTCTC trong cộng đồng.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng xác định các genotype HPV nhóm "nguy cơ thấp" và nhóm "chưa xác định được nguy cơ" liên quan không ý nghĩa với sự biến đổi tế bào cổ tử cung như kết quả các nghiên cứu trước, bộ gen của các genotype HPV "nguy cơ thấp" tồn tại độc lập với gen của tế bào chủ.

Theo kết quả nghiên cứu theo phương pháp phân tích tổng hợp của nhóm tác giả thuộc cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế IARC, các type HPV không chỉ có sự thay đổi theo các vùng địa lý khác nhau mà còn thay đổi theo từng loại ung thư như ung thư biểu mô gai hoặc ung thư biểu mô tuyến. Trong khi HPV 16 thường gặp ở ung thư biểu mô gai hơn thì ngược lại, HPV 18 lại thường gặp ở ung thư biểu mô tuyến [72].

Ở bệnh nhân có tổn thương biểu mô gai mức độ cao (High-grade squamous intra-epithelium lesion, HSIL), các genotype thường gặp là HPV 16, 31, 58, 18, 33, 52, 35, 51, 56, 45, 39, 66. Các genotype gây HSIL tương tự với tám genotype thường gặp ở các trường hợp UTCTC trên thế giới, ngoại trừ HPV 18 và HPV 45. HPV 16 vẫn là type gặp nhiều nhất trong tổn thương HSIL trên toàn thế giới, trong khoảng 34% ở châu Á đến 52% ở châu Âu còn HPV 18 đứng ở vị trí thứ tư dao động trong khoảng từ 6% ở Châu Âu đến 10% ở Bắc Mỹ [2].

Ở bệnh nhân có tổn thương biểu mô gai mức độ thấp (Low-grade squamous intra-epithelium lesion, LSIL), HPV 16 là type có tỷ lệ cao nhất (26%) trên toàn thế giới với khoảng từ 16% ở châu Phi đến 29% ở châu Âu, tiếp theo là HPV 31 (12%); HPV 51 (11%); HPV 53 (10%); HPV 18 (9%); HPV 66 (9%) và HPV 58 (8%) [2].

4.3.3. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và một số yếu tố nguy cơ khác

Mặc dù HPV là nhân tố cần thiết để gây ra ung thư nhưng quá trình biến đổi tế bào còn cần những đồng yếu tố tác động khác và đa số các yếu tố nguy cơ dẫn đến UTCTC là những yếu tố có mối liên quan chặt chẽ với nguy cơ nhiễm HPV. Nguy cơ UTCTC thường gặp hơn ở những phụ nữ có hoạt động tình dục tích cực, phụ nữ có hoạt động tình dục sớm, có nhiều bạn tình, có thai sớm, đẻ nhiều, mắc các bệnh lây truyền qua đường tình dục, hút thuốc lá, sử dụng thuốc tránh thai đường uống kéo dài [119].

Ngoài ra, tình trạng đồng nhiễm nhiều tác nhân lây truyền qua đường tình dục như *Trichomonas*, *C.trachomatis*, *Herpes simplex virus type 2 (HSV2)* có nguy cơ gây biến đổi tế bào dẫn tới ung thư cao 2,5-5 lần so với phụ nữ không bị nhiễm [120].

Kết quả bảng 3.17 cho thấy tình trạng nhiễm HIV liên quan chặt chẽ với tình trạng nhiễm HPV và những thay đổi bất thường tế bào biểu mô cổ tử

cung. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về kết quả xét nghiệm Pap smear giữa nhóm nhiễm và nhóm không nhiễm HIV với $p < 0,0001$. Một số yếu tố khác như yếu tố lứa tuổi, tình trạng hôn nhân, tình trạng hút thuốc lá, tiền sử sản khoa và tình trạng nhiễm *C. trachomatis* là những yếu tố liên quan có ý nghĩa với tình trạng nhiễm HPV nhưng không có sự khác biệt về kết quả tế bào học. Tuy nhiên, tỷ lệ đối tượng gái mại dâm có tế bào học bất thường trong nghiên cứu của chúng tôi thấp là một hạn chế cho việc phân tích đơn biến mối liên quan giữa các yếu tố nguy cơ với sự biến đổi tế bào.

KẾT LUẬN

1. Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng và một số yếu tố liên quan

1.1. Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng, Việt Nam là 51,1%.

1.2. Tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng liên quan tới lứa tuổi, tình trạng hôn nhân, tình trạng hút thuốc lá, tiền sử thai nghén, đồng nhiễm HIV và *C. trachomatis*.

2. Sự phân bố genotype HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng

2.1. Xác định 33 genotype HPV. Các genotype HPV “nguy cơ cao” chiếm đa số (75,87%), genotype “nguy cơ thấp” chiếm 16,5% và genotype “chưa xác định nguy cơ” chiếm 7,63%.

Genotype HPV 52 chiếm tỷ lệ cao nhất (13,33%), tiếp đến là HPV 16 (12,53%) và HPV 58 chiếm 8,09%. HPV 18 chiếm 6,5%.

2.2. Tình trạng đơn nhiễm genotype HPV trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng là 32,11% và tỷ lệ đa nhiễm genotype HPV chiếm 67,89%.

3. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và genotype HPV

3.1. Kết quả xét nghiệm sàng lọc Pap smears xác định: 70,6% trường hợp có tế bào cổ tử cung bình thường; 15,7% trường hợp có tế bào biểu mô biến đổi lành tính do viêm; 9,2% trường hợp có các tế bào chuyển sản; 4,5% trường hợp có thay đổi bất thường của tế bào biểu mô cổ tử cung. Chưa phát hiện trường hợp ung thư biểu mô hoặc ung thư tế bào tuyến cổ tử cung trên đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng.

3.2. Sự biến đổi tế bào cổ tử cung có liên quan chặt chẽ với tình trạng nhiễm genotype HPV “nguy cơ cao” (HPV-16, HPV-39, HPV-51, HPV-52, HPV-53 và HPV-68).

CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN CÓ LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN

- 1. Hoang Thi Thanh Huyen, Azumi Ashizaki, Nguyen Hung Cuong, Tran Thi Vuong, Kaori Matsushita, Kunikazu Saikawa, Norimitsu Hosaka, Pham Viet Hung, Xiuquiong Bi, Ta Thanh Van, Pham Van Thuc and Hiroshi Ichimura. (2013).** “Infection with High risk HPV types among Female sex workers in Northern Vietnam”. *Journal of Medical Virology*, 85, 2: pp. 288-295.
- 2. Azumi Ashizaki, Kaori Matsushita, Hoang Thi Thanh Huyen, Dorothy M. Agdamag, Nguyen Hung Cuong, Tran Thi Vuong, Toshiyuki Sasagawa, Kunikazu Saikawa, Raphael Lihana, Pham Viet Hung, Xiuquiong Bi, Ta Thanh Van, Pham Van Thuc and Hiroshi Ichimura. (2013).** “E6 and E7 variants of Human Papillomavirus-16 and -52 in Japan, the Philippines, and Vietnam”. *Journal of Medical Virology*, 85, 6: pp. 1069-1076.
- 3. Hoàng Thị Thanh Huyền. (2012).** “So sánh cặp mồi GP5+/GP6+ gốc và GP5+/GP6+ đã biến đổi trong phát hiện Human Papillomavirus”. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, Số 2, trang 93- 99.
- 4. Hoàng Thị Thanh Huyền, Tạ Thành Văn, (2012).** “Human Immunodeficiency Virus và Human Papillomavirus trên gái mại dâm tại Hải Phòng ,Việt Nam”. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, Số 80, trang 309-314.
- 5. Hoàng Thị Thanh Huyền, Tạ Thành Văn, (2011).** “Sự phân bố genotype của Human Papillomavirus trên gái mại dâm tại Miền Bắc Việt Nam”. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, Số 2, trang 7-11.

6. **Hoàng Thị Thanh Huyền, Tạ Thành Văn. (2011).** “Đánh giá một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ nhiễm Human Papillomavirus trên gái mại dâm”. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, Số 74, trang 387-391.
7. **Hoàng Thị Thanh Huyền, Tạ Thành Văn. (2011).** “Human Papillomavirus và ung thư cổ tử cung ở gái mại dâm tại miền Bắc Việt Nam”. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 386, trang 363-367.
8. **Hoàng Thị Thanh Huyền, Tạ Thành Văn, Phạm Văn Thúc. (2011).** “Human Papillomavirus và các bệnh lây truyền qua đường tình dục trên gái mại dâm tại miền Bắc Việt Nam”. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tháng 3, số 1, trang 40-44.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO. (2010). Human Papillomavirus and Related Cancers. Available at: http://apps.who.int/hpvcentre/statistic/dynamic/ico/country_pdf.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 127:2893-2917.
3. Burd EM. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Review*. 16(1):1-17.
4. Munoz N., Castellsagué X., de González A.B., Gissmann L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 24S3:1-10.
5. Bouvard V., Baan R., Straif K., et al. (2009). A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncology*.10:321-322.
6. Schiffman M., Rodriguez A.C., Chen Z., et al. (2010). A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res*. 70:3159-3169.
7. Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose´ S., et al. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medecine*. 348:518-527.
8. Clifford G., Franceschi S., Diaz M., Munoz N., Villa L.L. (2006). Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*. 24S3: 26-34.
9. Parkin D. M, Bray F., Ferlay J., Pisani P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer Journal Clinical*. 55: 74-108.
10. Harper D.M., Franco E.L., Wheeler C.M., et al. (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: Follow-up from a randomized control trial. *Lancet*. 367: 1247-1255.

11. Wheeler C.M. (2007). Advances in primary and secondary interventions for cervical cancer: Human papillomavirus prophylactic vaccines and testing. *National Clinical Practice Oncology*. 4:224-235.
12. Wheeler C.M., Castellsagué X., Garland S.M., et al. (2012). Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncology*. 13:100-110.
13. Clifford G.M., Gallus S., Herrero R., Muñoz N., et al. (2005). Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 366: 991-998.
14. Bao Y.P., Smith J.S., Qiao Y.L., ACCPAB members. (2008). Human papillomavirus type distribution in women from Asia: a meta-analysis. *International Journal of Gynecological cancer*.18(1):71-9.
15. Lin H., Ma Y.Y., Mo J.S., Ou Y.C., Shen S.Y., Chang Chien C.C. (2006). High prevalence of genital human papillomavirus type 52 and type 58 infection in women attending gynecologic practitioners in South Taiwan. *Gynecologic Oncology*. 101:40-45.
16. de Sanjose´ S., Diaz M., Castellsague´ X., Clifford G., Bruni L., Munoz N., Bosch FX. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: A meta-analysis. *Lancet Infectious Disease*. 7:453-459.
17. Miyashita M., Agdamag D.M., Sasagawa T., et al. (2009). High-risk HPV types in lesions of the uterine cervix of female commercial sex workers in the Philippines. *Journal of Medical Virology*. 81:545-551.
18. Ye J., Cheng X., Chen X., Ye F., Lü W., Xie X. (2010). Prevalence and risk profile of cervical human papillomavirus infection in Zhejiang Province, southeast China: a population-based study. *Virology*. 7:66.

19. Zur Hausen H. (2011). Vaccines: what remains to be done?. *Vaccine*. (10).11: 1505-1507
20. WHO. (2012). Guideline for the management of sexually transmitted infections in female sex workers. Available at: <http://www.who.int/healthinfo/survey/whsvnm-FSWs.pdf>.
21. Lowy D.R., Howley P.M., (2004), Papillomaviruses, *Field Virology*, 2, pp. 2231-2257.
22. Takashi Y., Tohru K. (2009). Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Medical Virology*. 2009; 19: 97–113.
23. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. (2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious Agent Cancer*.1; 4: 8.
24. De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324:17-27.
25. Bernard H.U., Burk R.D., de Villiers E.M, et al. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* .40:70–79.
26. Nicol A.F., Nuovo G.J., Dillner J., (2010). A summary of the 25th International Papillomavirus Conference 2009: Vaccines, screening, epidemiology and therapeutics. *Journal of Clinical Virology*. 47, pp. 208-215.
27. Bodaghi S., Wood L.V., Roby G., Ryder C., et al. (2005). Could human papillomaviruses be spread through blood?. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(11):5428-34.
28. Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. (2010). The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 31(11): 1905-12.

29. Buitrago-Pérez A. (2009). Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling. *Current genomics*. 10(1): 26-34.
30. Heber C.M., Laimins L. (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in medical virology*. 16(2): 83-97.
31. Lehoux M. (2009). Molecular Mechanisms of HPV-induced Carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 90: 432-465.
32. Anco M., Berhard K., Wim Q., Leen-J.D. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*. 32:43–51.
33. Moody C., Laimins L. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews Cancer*. 10(8): 550-60.
34. Tạ Thành Văn. (2010). PCR và một số kỹ thuật Y sinh học phân tử. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Y học. Trang 28-95.
35. Phạm Hùng Vân. (2009). PCR và real-time PCR: Các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Y học. Trang 9-35.
36. Nguyễn Vượng. (2006). Human Papillomavirus. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 6 – 22.
37. Solomon D., Davey D., Kurman R. et al. (2002). The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *Journal of American Medecine Assocation*. 287:2114–2119.
38. Nguyễn Trọng Hiếu. (2004). Tần xuất nhiễm HPV ở phụ nữ thành phố Hồ Chí Minh. *Thời sự Y Dược học*. 4(9): 195 – 199.
39. Nguyễn Thị Thi Thơ, Lê Thị Phương Mai, Nguyễn Thị Phương Liên, Phan Đăng Thân. (2008). Kiến thức, thái độ và thực hành đối với bệnh ung thư cổ tử cung và các biện pháp dự phòng của cha, mẹ các em gái tuổi vị thành niên thuộc hai huyện Từ Liêm - Hà Nội và Củ Chi - Thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Y học dự phòng*. 2:5-11.

40. Nguyễn Thị Ngọc Dung. (2004). Khảo sát sự liên quan giữa mẹ nhiễm HPV và con bệnh u nhú thanh quản. *Thời sự Y Dược học*. 4(9): 199-202.
41. Hernandez B. Y., T. V. Nguyen. (2008). Cervical human papillomavirus infection among female sex workers in southern Vietnam. *Infectious Agents and Cancer*. 3(1): 7.
42. Matsushita K., Miyashita M., Ishizaki A., et al. (2011). Oral and cervical Human Papillomavirus infection among female sex workers in Japan. *Japan journal of infectious disease*. 64: 34 - 39.
43. Chan R., Khoo L., et al. (2001). A comparative study of cervical cytology, colposcopy and PCR for HPV in female sex workers in Singapore. *International Journal STD & AIDS*. 12(3): 159-163.
44. Tahmina S., Alam A., Dipak K. M., Donald J. G., (2008). Prevalence and Genotyping of Human Papillomavirus (HPV) in Female with High-Risk Behaviour in Dhaka, Bangladesh. *Bangladesh J Microbiol*. 25(1): 65 - 68.
45. Kathleen F., Dewa N., Noo. A., et al. (2003). The Bali STD. AIDS Study human papillomavirus infection among female sex workers *International Journal of STD & AIDS*. 14: 681 - 687.
46. Chandeying V., Garland S.M., Tabrizi S.N. (2006). Prevalence and typing of human papilloma virus (HPV) among female sex workers and outpatient women in southern Thailand. *Sex Health*. 3(1): 11-14.
47. Couture M.C., Ellen S.S., Sansothy N., et al. (2012). Cervical human papillomavirus infection among young women engaged in sex work in PhnomPenh, Cambodia. *BMC Infectious Diseases*. 12(166): 1744 - 1756.
48. Ghosh I., Ghosh P., Bharti A.C., et al. (2012). Prevalence of human papillomavirus and co-existent sexually transmitted infections among female sex workers, men having sex with men and injectable drug abusers from eastern India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 13(3): 799-802.

49. Choi B. S., Kim O., Park M.S., et al. (2003). Genital human papillomavirus genotyping by HPV oligonucleotide microarray in Korean commercial sex workers. *Journal of Medical Virology*. 71(3): 440-445.
50. Li H., Liang G., Yin Y.P., et al. (2012). Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection among female sex workers in Guangxi, China: implications for interventions. *Journal of Medical Virology*. 84(5): 798-803.
51. Wang X., Gu D., Lou B., et al. (2013). Hospital-based prevalence of high-risk cervical HPV types infecting the general population and female sex workers in Huzhou, China. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 120(1): 37-41.
52. Jua´Rez-Figueroa L.A., Uribe-Salas F.J., Carlos Z.M., et al. (2000). A Highly Prevalent Sexually Transmitted Disease Agent Among Female Sex Workers From Mexico City. *Journal of Medical Virology*. 12(6): 125 - 129.
53. Luchters S.M., Broeck D.V., Chersich M.F., et al. (2010). Association of HIV infection with distribution and viral load of HPV types in Kenya: a survey with 820 female sex workers. *BMC Infectious Disease*. 10: 18-24.
54. del Amo J., Gonza´lez C., Losana J., et al. (2005). Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain. *Sexually Transmitted Infections*. 81:79-84.
55. Montano S.M., Hsieh E.J., Caldero´n M., et al. (2011). Human papillomavirus infection in female sex workers in Lima, Peru. *Sexually Transmitted Infections*. 87:81-82.

56. Mak R. (2004). Cervical smears and human papillomavirus typing in sex workers. *Sexually Transmitted Infections*. 80(2): 118-120.
57. Trường Đại học Y Hà Nội. (2001). Dịch tễ học và thống kê ứng dụng trong nghiên cứu khoa học. Mạng lưới đào tạo và tư vấn sức khỏe cộng đồng. Hà Nội. Trang 32-47.
58. Văn phòng khu vực Tây Thái Bình Dương – Tổ chức Y tế thế giới. (2003). Phương pháp nghiên cứu sức khỏe: Hướng dẫn đào tạo phương pháp nghiên cứu. *Nhà xuất bản Y học*. Trang 63-73.
59. de Roda Husman A.M., Walboomers J.M., van den Brule A.J., et al. (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 76:1057-1062.
60. Franceschi S., Herrero R., Clifford C.M., et al. (2006). Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *International Journal of Cancer*. 119(11): 2677-2684.
61. Bruni, L., M. Diaz, de Sanjosé S., et al. (2010). Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *The Journal of Infectious Diseases*. 202(12): 1789-1799.
62. Luchters S.M., Vanden Broeck D., Temmerman M., et al. (2010). Association of HIV infection with distribution and viral load of HPV types in Kenya: a survey with 820 female sex workers. *BMC Infectious Diseases*. 26;10:18.
63. Tideman R.L., B Rose B., Berry A.G., et al. (2003). Cervical human papillomavirus infections in commercial sex workers—risk factors and behaviours. *International Journal of STD & AIDS*. 14: 840 - 847.

64. Peng R.R., Li H.M., Chang H., et al. (2012). Prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus infection among female sex workers in Asia: a systematic literature review and meta-analysis. *Sexual Health*. 9(2): 113-119.
65. Yun, H., Park J., Kim S., et al. (2008). Prevalence of human papillomavirus and herpes simplex virus type 2 infection in Korean commercial sex workers. *J Microbiol Biotechnol*. 18(2): 350-354.
66. Anh P. T. H., Hieu N.T., Franceschi S., et al. (2003). Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam. *International Journal of Cancer* 104(2): 213-220.
67. Tahmina S., Anadil Alam M.H., Donald J., et al. (2008). Prevalence and Genotyping of Human Papillomavirus (HPV) in Female with High-Risk Behaviour in Dhaka, Bangladesh. *Bangladesh Journal of Microbiology*. 25(1): 65 - 68.
68. Clarke M.A., Rodriguez A.C., Schiffman M., et al. (2012). A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis*. 10: 12-33.
69. Vaccarella S., Franceschi S., Meijer C.J., et al. (2006). Sexual Behavior, Condom Use, and Human Papillomavirus: Pooled Analysis of the IARC Human Papillomavirus Prevalence Surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15(2): 326-333.
70. Shew M., McGlennen R., Anderson S., et al. (2002). Oestrogen receptor transcripts associated with cervical human papillomavirus infection. *Sex Transm Infect*. 78(3): 210–214.
71. Burchell A.N., Rachel L., Franco E.L., et al. (2006). Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 24:52–61.

72. Vaccarella S., Herrero R., Franceschi S., et al. (2008). Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *International Journal of Epidemiology*. 37:536–546.
73. Gunnell A.S., Tran N.T., Torrang A. (2006). Synergy between Cigarette Smoking and Human Papillomavirus Type 16 in Cervical Cancer *In situ* Development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15:2141-2147.
74. Moscicki A.B. (2010). The role of sexual behavior and HPV persistence in predicting repeated infections with new HPV types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 19(8): 2055-65.
75. Smith J., Melendy A., Rashida K. Rana, M., Jeanne M. Pimenta. (2008). Age-Specific Prevalence of Infection with Human Papillomavirus in Females: A Global Review. *Journal of Adolescent Health*. 43: 5–25.
76. Kim Y.H., Park J.S., Song Y.S., et al. (2013). Genotypic prevalence of human papillomavirus infection during normal pregnancy: A cross-sectional study. *J Obstet Gynaecol Res*. 10 (2): 11-21.
77. Lee J., Jung S-Y., Park B.J., et al. (2010). Condom Use and Prevalence of Genital Chlamydia trachomatis Among the Korean Female Sex Workers. *Epidemiology and Health*. 32: 1211 – 1217.
78. William C.W., Mal W., Yim Y.L., Lynn H. (2010). Sexually Transmitted Infections Among Female Sex Workers in Hong Kong: The Role of Migration Status. *Journal of Travel Medicine*. 10:238 – 247.
79. Wi T., Ramos E.R., Dallabetta G., et al. (2006). STI declines among sex workers and clients following outreach, one time presumptive treatment, and regular screening of sex workers in the Philippines. *Sex Transm Infect*. 82:386–391.

80. WHO. (2009). Overview and estimates global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Available at: <http://www.who.int/healthinfo/survey/whsvnm-STIs.pdf>.
81. UNAIDS. (2010). Epidemic update: 2010 global report. Available at: <http://www.unaids.int/epithelth/survey/bnsje-STIs.pdf>
82. Bộ Y tế. (2013). Tổng kết công tác phòng, chống HIV/AIDS năm 2013 và định hướng kế hoạch năm 2014. 06/BC-BYT.
83. Marais D.J., Carrara H., Williamson A.L., et al. (2009). HIV-1 seroconversion promotes rapid changes in cervical human papillomavirus (HPV) prevalence and HPV-16 antibodies in female sex workers. *J Med Virol* 81(2):203-10.
84. Ishizaki A., Cuong N.H., Ichimura H., et al. (2009). Profile of HIV Type 1 Infection and Genotypic Resistance Mutations to Antiretroviral Drugs in Treatment-Naive HIV Type 1-Infected Individuals in Hai Phong, Viet Nam. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 25(2): 175-182.
85. Tuan N.A., Fylkesnes K., O'Farrell N., et al. (2007). Human immunodeficiency virus (HIV) infection patterns and risk behaviours in different population groups and provinces in Viet Nam. *Bulletin of the WHO*. 85:35-41.
86. Wang H., Wang N., Wu Z., et al. (2008). Prevalence and predictors of herpes simplex virus type 2 infection among female sex workers in Yunnan Province, China. *Int J STD AIDS*. 19(9): 635–639.
87. IBBS. (2007). Intergrated Biological Behavioral Surrvellance among Most at Risk group in Indonesia- 2007. *Surrvellance Female sex workers*. Available at: http://apps.ibbs.org.int/healthscience/statistic/dynamic/ico/indonesia_pdf.

88. WHO. (2009). Global blood safety and availability. http://apps.who.int/globalsafety/statistic/dynamic/sev/country_pdf.
89. Nguyen H.C., Ishizaki A., Ichimura H., et al. (2012). Prevalence of HBV Infection Among Different HIV-Risk Groups in Hai Phong, Vietnam. *Journal of Medical Virology*. 83:399–404.
90. Linda D., Michael J.C., Nguyen T.L.A., et al. (2012). Hepatitis C virus in Vietnam: High prevalence in Dialysis and Multi-transfused Patients involving disease and novel virus variants. *The journal of medical virology* 7: 2166 - 2178.
91. Dorothy M.A., Seiji K., Hiroshi I., et al. (2005). Rapid spread of Hepatitis C Virus among Injecting-Drug Users in Philippine Implication for HIV Epidemics. *The journal of medical virology* 77:221-226.
92. Tatjana V.C., Ira G.M., Adriana V., et al. (2009). Seroprevalence, risk factors and Hepatitis C virus genotypes in Groups with high-risk Sexual behavior in Croatia. *The journal of medical virology* 81: 1348 - 1353.
93. Duong T.C., Nguyen T.H., Roger D., et al. (2008). Sexual risk and bridging behaviors among young people in HaiPhong, Vietnam”. *AIDS behaviors*. 12 (4): 643 – 651.
94. Iftner T., Villa L.L. (2003). Chapter 12: Human Papillomavirus Technologies. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 31: 80 – 88.
95. Zaravinos A., Mammias I.N., Sourvinos G., Spandidos D.A. (2009). Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers*. 24:215-222.

96. Jones J., Powell N.G., Hibbitts S., et al. (2009). Comparison of the PapilloCheck DNA micro-array Human Papillomavirus detection assay with Hybrid Capture II and PCR-enzyme immunoassay using the GP5/6+ primer set. *J Clin Virol.* 10:100-104.
97. Ermel A., Qadadri B., Brown D., et al. (2010). Human papillomavirus detection and typing in thin prep cervical cytologic specimens comparing the Digene Hybrid Capture II Assay, the Roche Linear Array HPV Genotyping Assay, and the Kurabo GeneSquare Microarray Assay. *J Virol Methods* 169(1):154-61.
98. Gheit T., Landi S., Tommasino M., et al. (2006). Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol.* 44:2025–2031.
99. Inglis S., Shawb A., Koenig S. (2006). Chapter 11: HPV vaccines: Commercial Research & Development. *Vaccine.* 24: 99–105.
100. Molijn A., Kleter B., Quint W., van Doorn L.J. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 32 Suppl 1:S43-51.
101. Qu W., Jiang G., Burk R.D., et al. (1997). PCR detection of human papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J ClinMicrobiol* 35: 1304–1310.
102. Christopher P., Derek W., Quade B.J. (2003). Cervical Cancer Screening: From the Papanicolaou Smear to the Vaccine Era. *Journal of Clinical Oncology.* 21(10): 224-230.
103. Paavonen J., Salmerón J., F. Struyf F., et al. (2009). Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet.* 10(374): 301–314.

104. Nielsen A., Kjaer S.K., Munk C., Iftner T. (2008). Type-specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. *Sex Transm Dis.*35: 276–282.
105. van der Graaf Y., Molijn A., van den Tweel J., et al. (2002). Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol.* 156:158 – 64.
106. Herrero R., Hildesheim A., Bratti C., et al. (2000). Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:464 – 74.
107. Fife K.H., Cramer H.M., Schroeder J.M., Brown D.R. (2001). Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J Med Virol.* 64:550 – 9.
108. WHO. (2005). World Health Survey, Vietnam. Available at: <http://www.who.int/healthinfo/survey/whsvnm-vietnam.pdf>.
109. Domingo E.J., Noviani R., Quinn M.A., et al. (2008). Epidemiology and Prevention of Cervical Cancer in Indonesia, Malaysia, the Philippines, Thailand and Vietnam. *Vaccine.*26S M71–M79.
110. Pista A., de Oliveira C.F., Real O., et al. (2012). Risk factors for human papillomavirus infection among women in Portugal: The CLEOPATRE Portugal Study. *Int J Gynaecol Obstet.* 118:112-116.
111. Spinillo A., Dal Bello B., Gardella B., et al. (2009). Multiple human papillomavirus infection and high grade cervical intraepithelial neoplasia among women with cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol.* 113: 115–119.

112. Bosch F.X., Lorincz A., Munoz N., et al. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 55: 244– 265.
113. Greenberg J., Magder L., Aral S. (2002). Age at first coitus: a marker for risky sexual behavior in women. *Sex Transm Dis.* 19:331–334.
114. Jessica A., Susan L., Burd D., et al. (2002). Mediators of the Association Between Age of First Sexual Intercourse and Subsequent Human Papillomavirus Infection. *Pediatric.* 109 (10). 1 – 8.
115. Nicol A.F., Fernandes A.T.G., Bonecini-Almeida M.G. (2005). Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection – Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(1): 1-12.
116. Grayman J.H., Nhan D.T., Minh T., et al. (2005). Factors associated with HIV testing, condom use, and sexually transmitted infections among female sex workers in Nha Trang, Vietnam. *AIDS Behav* 9(1):41-51.
117. zur Hausen H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology* 384, 260–265.
118. Schwarz E., Freese U.K., zur Hausen H., et al. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature.* 314(6006):111-4.
119. Elizabeth I., Garner O. (2003). Cervical Cancer: Disparities in Screening, Treatment, and Survival. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 12: 242–247.
120. Yugawa T., Kiyono T. (2009). Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Reviews in Medical Virology.* 97-113.

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

=====

HOÀNG THỊ THANH HUYỀN

Xác định tần suất nhiễm virus genotype
cũ
Human Papillomavirus trên giới nữ
đến
tại Hội Phụ Sản, Việt Nam

CHUYÊN NGÀNH: HÓA SINH Y HỌC

Mã số: 62720112

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Cố vấn khoa học:

GS.TS. HIROSHI ICHIMURA

Hướng dẫn khoa học:

GS.TS. TẠ THÀNH VĂN

PGS.TS. TRẦN VĂN HỢP

HÀ NỘI – 2014

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên tôi muốn được bày tỏ là lòng biết ơn sâu sắc nhất tới Thầy Tạ Thành Văn, GS.TS. Phó Hiệu trưởng Trường Đại học Y Hà Nội, là người hướng dẫn khoa học, đã luôn giúp đỡ tôi, tận tình truyền đạt những kiến thức và những kinh nghiệm quý báu để tôi có thể hoàn thành luận án. Những kết quả tôi đạt được ngày hôm nay có sự dày công vun đắp của Thầy, Người tôi luôn kính trọng.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc tới PGS.TS. Trần Văn Hợp, phó chủ tịch Hội Gan mật Việt Nam, Chủ tịch Hội đồng Trung tâm nghiên cứu phòng chống ung thư, giáo viên đồng hướng dẫn. Thầy đã luôn nhiệt tình giúp đỡ, chỉ bảo, động viên tôi trong quá trình học tập và thực hiện nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn trân trọng tới GS.TS. Hiroshi Ichimura, Trưởng khoa Virus học và hợp tác Sức khỏe Quốc tế, Trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản, là người đã tận tình giúp đỡ, trực tiếp hướng dẫn tôi thực hiện nghiên cứu, tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án ngày hôm nay.

Tôi xin mãi khắc ghi sự tận tâm của Người Thầy, GS.TS. Phạm Văn Thức, Hiệu trưởng Trường Đại học Y Hải Phòng. Thầy là người luôn định hướng cho tôi trong nghiên cứu, truyền dạy cho tôi biết bao kiến thức khoa học và cuộc sống. Sự trưởng thành của tôi trên mỗi bước đường khoa học cũng như trong sự nghiệp đều có bàn tay và khối óc của Thầy. Sự động viên, giúp đỡ và dìu dắt của Thầy đã cho tôi thêm nghị lực để vượt lên chính mình, vượt lên những khó khăn trở ngại.

Bằng tình cảm yêu mến và lời cảm ơn chân thành, tôi xin gửi tới các Thầy Cô, các anh chị và các bạn đồng nghiệp Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein của Trường Đại học Y Hà Nội đã quan tâm, giúp đỡ, hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn trân trọng tới:

- *Ban Giám hiệu, Phòng đào tạo sau đại học, Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội.*
- *Ban Giám hiệu, Bộ môn Hóa sinh, Khoa Cử nhân kỹ thuật Y học, Khoa xét nghiệm Trường Đại học Y Hải Phòng.*
- *Ban lãnh đạo cùng toàn thể các nghiên cứu viên và thành viên của Khoa Virus học, Khoa giải phẫu bệnh Trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản.*
- *Ban Lãnh đạo cùng toàn thể cán bộ và nhân viên của Trung tâm phục hồi nhân phẩm Thanh Xuân, Hải Phòng.*

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới các đối tượng nghiên cứu đã tình nguyện hợp tác giúp tôi thực hiện được nghiên cứu này.

Cuối cùng, tôi xin ghi nhớ công ơn sinh thành, nuôi dưỡng và tình yêu thương của Cha mẹ tôi, Cha mẹ Chồng cùng sự ủng hộ, động viên, thương yêu chăm sóc, khích lệ của Chồng, con và anh chị em trong gia đình, những người đã luôn ở bên tôi, là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

Hải Phòng, tháng năm 2014

Hoàng Thị Thanh Huyền

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu khoa học của riêng tôi, tất cả những kết quả và số liệu trong luận án do chính tôi thực hiện.

Tất cả số liệu và kết quả được trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành trong nước và nước ngoài.

Phần còn lại trong luận án chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào khác.

Tác giả luận án

Hoàng Thị Thanh Huyền

Nghiên cứu được thực hiện dựa trên thỏa thuận hợp tác nghiên cứu khoa học giữa Trường Đại học Y Hải Phòng, Việt Nam và Khoa Y Trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản với đề tài hợp tác nghiên cứu "**Giám sát các bệnh lây truyền qua đường tình dục ở đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng, Việt Nam**".

Đại diện phía Việt Nam: **GS.TS. PHẠM VĂN THỨC**

Đại diện phía Nhật Bản: **GS.TS. HIROSHI ICHIMURA**

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ASC-H	Atypical squamous cell cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion. Tế bào biểu mô vảy không điển hình nhưng chưa loại trừ tổn thương nội biểu mô vảy độ cao.
ASC-US	Atypical squamous cell of undetermined significance Tế bào biểu mô vảy không điển hình, ý nghĩa chưa xác định
bp	base pair Cặp bazơ
C. trachomatis	Chlamydia trachomatis
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia. Tân sản nội biểu mô.
DNA	DeoxyRibonucleic Acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
FDA	United State Food and Drug Administration Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ
G3PDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Gp	Glycoprotein
HBV	Hepatitis B virus Vi rút viêm gan B
HCV	Hepatitis C virus Vi rút viêm gan C
HIV	Human immunodeficiency virus Vi rút gây suy giảm miễn dịch mắc phải ở người
HPV	Human Papillomavirus Vi rút gây u nhú ở người

HSIL	High-grade squamous intraepithelial lesion Tổn thương nội biểu mô vảy độ cao.
LCR	Long Control Region Vùng điều hòa dài
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion Tổn thương nội biểu mô vảy độ thấp.
N. gonorrhoeae	Neisseria gonorrhoeae
NILM	Negative for Intraepithelial lesion or malignancy. Không có tổn thương biểu mô hoặc tổn thương ác tính.
OD	Optical Density Mật độ quang
PCR	Polymerase Chain Reaction Phản ứng khuếch đại chuỗi
RNA	RiboNucleic Acid
SD	Standard Deviation Độ lệch chuẩn
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
STIs	Sexually Transmitted Infections. Nhiễm trùng lây truyền qua đường tình dục
TM	Melting temperature Nhiệt độ biến tính
IARC	International Agency for Research on Cancer Tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Đặc điểm chung của Human Papillomavirus	4
1.1.1. Hình thái và cấu trúc của HPV	4
1.1.2. Đặc điểm cấu trúc và chức năng các gen của HPV	4
1.2. Phân loại HPV	10
1.2.1. Lịch sử phân loại	10
1.2.2. Phân loại HPV	11
1.3. Chu kỳ sống của HPV	14
1.4. Cơ chế gây bệnh của HPV	16
1.5. Đường lây truyền, các yếu tố nguy cơ gây nhiễm HPV	17
1.5.1. Đường lây truyền của HPV	17
1.5.2. Các yếu tố nguy cơ gây nhiễm HPV	18
1.6. Cách phòng nhiễm HPV	18
1.7. Các bệnh lý thường gặp do HPV và các điều trị	18
1.7.1. Các bệnh lý thường gặp do HPV	18
1.7.2. Điều trị	19
1.8. Các phương pháp phát hiện HPV ở mức độ phân tử và xét nghiệm mô bệnh học	19
1.8.1. Các phương pháp phát hiện HPV ở mức độ phân tử	19
1.8.2. Xét nghiệm mô bệnh học	27
1.9. Tình hình nhiễm HPV tại Việt Nam và trên thế giới	27
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	29
2.1. Đối tượng nghiên cứu	29
2.2. Phương pháp nghiên cứu	30
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu	30

2.2.2. Thu thập mẫu nghiên cứu	31
2.3. Quy trình kỹ thuật phân tích mẫu nghiên cứu	32
2.3.1. Sơ đồ quy trình phân tích mẫu nghiên cứu.....	33
2.3.2. Quy trình kỹ thuật phát hiện HPV DNA và xác định genotype HPV ..	33
2.3.3. Quy trình kỹ thuật xét nghiệm tế bào cổ tử cung theo phương pháp Papanicolaous.....	49
2.4. Xử lý số liệu.....	51
2.5. Đạo đức nghiên cứu Y học	51
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	52
3.1. Tỷ lệ nhiễm HPV ở đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng và một số yếu tố liên quan	52
3.1.1. Tỷ lệ nhiễm HPV ở đối tượng gái mại dâm tại Hải Phòng.....	52
3.1.2. Một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng	55
3.2. Sự phân bố genotype HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng.....	63
3.2.1. Kết quả xác định genotype HPV bằng phương pháp DNA microarray và phương pháp giải trình tự sau tách dòng.....	63
3.2.2. Sự phân bố và tình trạng đơn đa nhiễm genotype HPV.....	70
3.3. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và genotype HPV	80
3.3.1. Kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung trên gái mại dâm tại Hải Phòng	80
3.3.2. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và HPV.....	81
3.3.3. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và một số yếu tố nguy cơ khác	83
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	85
4.1. Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng và một số yếu tố liên quan ..	85
4.1.1. Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng.....	85

4.1.2. Một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng.....	91
4.2. Sự phân bố genotype HPV ở gái mại dâm tại Hải Phòng.....	102
4.2.1. Xác định genotype HPV bằng phương pháp DNA microarray và phương pháp giải trình tự sau tách dòng.....	102
4.2.2. Sự phân bố và tình trạng đơn đa nhiễm genotype HPV.....	107
4.3. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và genotype HPV	117
4.3.1. Kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung trên gái mại dâm tại Hải Phòng.....	117
4.3.2. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và HPV.....	119
4.3.3. Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và một số yếu tố nguy cơ khác.....	121
KẾT LUẬN.....	123
CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN CÓ LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Tỷ lệ nhiễm HPV trên gái mại dâm ở một số nước trên thế giới	29
Bảng 2.2.	Trình tự nucleotide của các môi GP5+/GP6+.....	34
Bảng 3.1.	Mối liên quan của tuổi, tình trạng hôn nhân, trình độ học vấn, tình trạng hút thuốc lá và sử dụng ma túy đến tỷ lệ nhiễm HPV	55
Bảng 3.2.	Mối liên quan của tiền sử sản phụ khoa đến tỷ lệ nhiễm HPV	57
Bảng 3.3.	Mối liên quan của các bệnh lây truyền qua đường tình dục đến tỷ lệ nhiễm HPV.....	59
Bảng 3.4.	Kết quả phân tích hồi quy đa biến giữa một số yếu tố liên quan có ý nghĩa thống kê với tình trạng nhiễm HPV.....	61
Bảng 3.5.	Kết quả xác định genotype HPV bằng giải trình tự gen sau tách dòng.	65
Bảng 3.6.	Sự phân bố genotype HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng.....	70
Bảng 3.7.	Tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng.....	72
Bảng 3.8.	Mối liên quan của lứa tuổi và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV	74
Bảng 3.9.	Mối liên quan của tình trạng hôn nhân và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV	75
Bảng 3.10.	Mối liên quan của tình trạng hút thuốc lá và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV	76
Bảng 3.11.	Mối liên quan của tiền sử có thai và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV	77
Bảng 3.12.	Mối liên quan của tình trạng nhiễm HIV và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV	78
Bảng 3.13.	Mối liên quan của tình trạng nhiễm C.trachomatis và tình trạng đơn, đa nhiễm genotype HPV	79
Bảng 3.14.	Kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung trên gái mại dâm tại Hải Phòng	80
Bảng 3.15.	Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và HPV	82
Bảng 3.16.	Mối liên quan giữa biến đổi tế bào cổ tử cung và một số yếu tố nguy cơ khác	84

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Hạt vi rút của HPV	4
Hình 1.2.	Cấu trúc bộ gen của Papillomavirus và HPV 16	5
Hình 1.3.	Cây phả hệ của 118 genotype Papillomavirus dựa trên trình tự gen vùng L1 ORF. Chuỗi gen được xử lý bằng phần mềm Phylip version 3.572 và phân tích phả hệ bằng Treeview program	12
Hình 1.4.	Chu kỳ sống của HPV	16
Hình 1.5.	Phương pháp lai phân tử phát hiện HPV	20
Hình 1.6.	Phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ phát hiện HPV	22
Hình 1.7.	Sự phân bố tỷ lệ nhiễm HPV ước tính trên thế giới	28
Hình 2.1.	Kit xác định genotype HPV bằng kỹ thuật DNA microarray	36
Hình 2.2.	Genotype HPV phát hiện bằng kỹ thuật DNA microarray trên máy scan	45
Hình 2.3.	Vectơ tách dòng pCR [®] 2.1.....	47
Hình 3.1.	Kết quả kiểm tra độ tinh sạch và định lượng nồng độ DNA tổng số trên máy NanoDrop.....	52
Hình 3.2.	Kết quả khuếch đại 140 bp vùng gen L1 HPV bằng phản ứng PCR với môi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified ...	53
Hình 3.3.	Kết quả xác định genotype HPV bằng kỹ thuật DNA microarray ..	63
Hình 3.4.	Kết quả biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào khả biến E.coli chủng InV α F'	64
Hình 3.5 .	Kết quả giải trình tự gen sau tách dòng(mẫu HPV-2-068 khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng môi GP5+/GP6+ modified)...	67
Hình 3.6.	So sánh kết quả giải trình gen sau tách dòng (mẫu HPV-2-068) với trình tự gen đã công bố trên GeneBank.....	68
Hình 3.7.	Sơ đồ kết quả xác định tỷ lệ nhiễm và genotype HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng.	69
Hình 3.8.	Sự phân bố genotype HPV trên gái mại dâm tại Hải Phòng.....	71
Hình 3.9.	Tình trạng đơn nhiễm và đa nhiễm genotype HPV ở gái mại dâm tại Hải Phòng.....	73
Hình 3.10.	Kết quả xét nghiệm tế bào cổ tử cung trên gái mại dâm tại Hải Phòng .	80