

1. 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.

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. 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. Tám genotype HPV (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -45, -52, và -58) 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. Tuy nhiên, sự phân bố các genotype HPV thay đổi theo từng vùng địa lý và theo từng sắc tộc khác nhau. 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.

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 (và tử vong hơn 3000 trường hợp mỗi năm. 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.

2. MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI

Đề tài "Xác định tỷ lệ nhiễm và genotype của Human Papillomavirus trên gai mại dâm tại Hải Phòng, Việt Nam" được thực hiện với các mục tiêu sau:

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

3. TÍNH CẤP THIẾT, Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA LUẬN ÁN

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. 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. Các kết quả nghiên cứu về sự phân bố dịch tễ học genotype HPV còn hạn chế.

Đề tài tiến hành tiến hành xác định sự phân bố genotype HPV trên đối tượng gai mại dâm, đối tượng góp phần không nhỏ trong việc lây truyền các bệnh lây truyền qua đường tình dục, đặc biệt trong việc lây truyền HPV. Do đó, nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm HPV cũng như sự phân bố genotype HPV trên đối tượng gai mại dâm là hướng nghiên cứu đang được các nhà khoa học rất quan tâm.

Công trình khoa học của luận án được tiến hành nghiên cứu bằng những kỹ thuật tiên tiến, có độ chính xác và độ tin cậy cao. Thiết kế nghiên cứu chặt chẽ và kết quả nghiên cứu có đóng góp gợi ý cho việc triển khai vắc xin tại Việt Nam.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1. Đặc điểm chung của Human Papillomavirus (HPV)

HPV thuộc họ Papillomaviridae, có vật liệu di truyền là DNA, tồn tại dạng siêu xoắn hình vòng (circular ds-DNA). Bộ gen chia 2 vùng: vùng gen sớm (E1, E2, E4, E5, E6, E7) và vùng gen muộn (L1, L2).

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.

(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) 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.

Chu kỳ sống của HPV liên quan chặt chẽ với tế bào biểu mô vật chủ, được chia làm 4 giai đoạn bao gồm: giai đoạn xâm nhập, giai đoạn tiềm tàng, giai đoạn nhân bản mạnh và giai đoạn giải phóng.

Cơ chế gây bệnh của HPV gồm giai đoạn xâm nhập chuỗi gen của HPV vào tế bào chủ, gây bất tử hóa tế bào, gây bất ổn định gen tế bào chủ, gây biến đổi đáp ứng với phá hủy DNA và gây tăng sinh và biệt hóa tế bào.

2. Các phương pháp phát hiện HPV ở mức độ phân tử

Phương pháp lai phân tử

Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

Phương pháp real-time PCR

Phương pháp DNA microarray (Phương pháp DNA chip)

Phương pháp giải trình tự gen trên máy tự động

3. 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.

Tại Việt Nam, tỷ lệ nhiễm HPV trong cộng đồng dân cư nữ từ 2% đến 10,9% thay đổi theo vùng địa lý

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

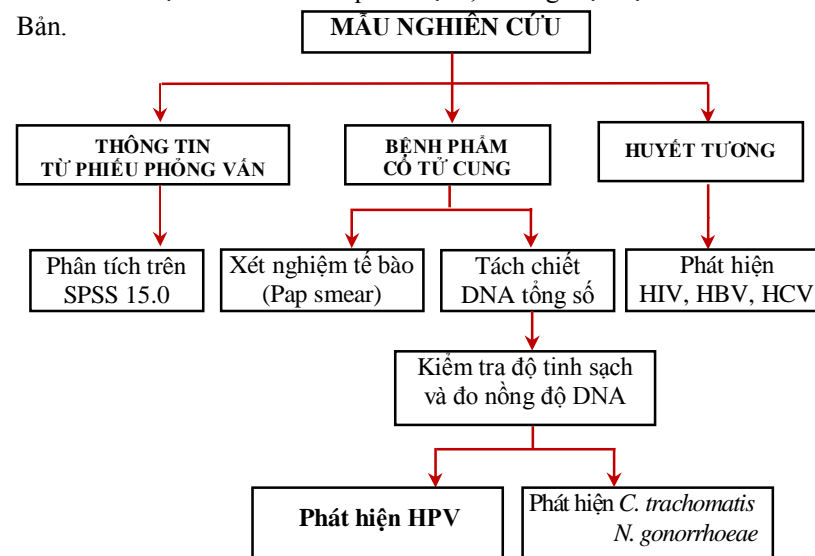
Đối tượng nghiên cứu gồm 479 gái mại dâm tuổi từ 16 đến 52, được tập trung quản lý tại Trung tâm phục hồi nhân phẩm Thanh Xuân - Hải Phòng.

2. Thiết kế nghiên cứu

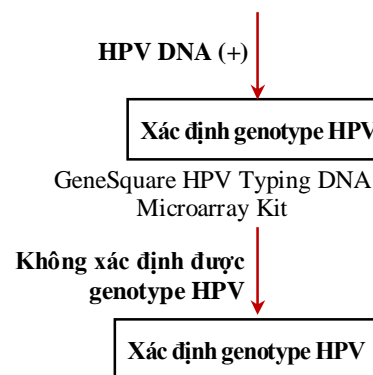
Tiến hành nghiên cứu mô tả cắt ngang, cỡ mẫu được áp dụng theo công thức $n = (Z_{1-\alpha})^2 \cdot [p \cdot (1-p)/D^2]$

3. Thu thập mẫu nghiên cứu

Nội dung tiến hành thu thập mẫu nghiên cứu gồm: Thu thập thông tin từ phiếu phỏng vấn đã soạn sẵn; Khám sản phụ khoa và lấy bệnh phẩm cổ tử cung; Lấy máu tĩnh mạch. Mẫu nghiên cứu được tiến hành phân tích tại Khoa virus học và Khoa Giải phẫu bệnh, trường Đại học Kanazawa- Nhật Bản.



Khuếch đại gen L1 HPV bằng PCR với mỗi GP5+/GP6+ original và GP5+/GP6+ modified



Sơ đồ phân tích mẫu nghiên cứu

1. Phát hiện HPV DNA

• Sử dụng môi GP5+/GP6+ original

Thành phần	Thể tích (μ l)
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 μ l

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**

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
DNA tách chiết	5
Tổng thể tích	50 μl

Chu trình nhiệt:

95°C	10 phút
95°C	30 giây

45 chu kỳ

45°C	30 giây
74°C	30 giây
74°C	10 phút
4°C	vô cùng

2. Kỹ thuật xác định genotype HPV

• **Kỹ thuật DNA microarray** (GeneSquare HPV Typing DNA Microarray Kit):

- + Khuếch đại HPV DNA bằng phản ứng multiplex PCR.
- + Lai DNA chuỗi đơn.
- + Đọc kết quả.

• **Phương pháp giải trình tự gen sau dòng hóa**

- + Ghép nối gen và biến nạp DNA plasmid vào *E.coli* chủng InVαF⁷.
- + Kiểm tra kết quả ghép nối gen bằng phản ứng PCR với cặp mồi khuếch đại vùng gen lacZα của vector tách dòng pCR[®]2.1.
- + Nuôi *E.coli* mang DNA plasmid.
- + Tách chiết và tinh sạch DNA plasmid.
- + Xác định trình tự gen bằng máy tự động.
- + Phân tích trình tự DNA HPV xác định genotype.

3. 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.

4. 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.

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

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 mỗi GP5+/GP6+original có kích thước 140 bp (HPV DNA dương tính) và 245 mẫu sản phẩm PCR sử dụng mỗi 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 mỗi GP5+/GP6+original là 51,4% và với mỗi 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

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

Liên quan với tình trạng nhiễm HPV	Gái mại dâm		Phân tích đơn biến			Phân tích đa biến			
	n	%	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	
Tuổi	≤ 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				
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				
Có sử dụng 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				
Chưa có thai	134	28,0	1,6	1,05 - 2,4	0,032	1,1	0,6 - 1,8	0,68	

Yếu tố	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	
<i>C.trachomatis</i>	Âm tính	432	90,2		1				
	Dương tính	26	5,4	2,7	1,1 - 6,5	0,027	2,4	0,9 - 5,9	
	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 gái 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

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 dương tính khi khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng mỗi 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.

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

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	HPV-90

		tính	
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 phản ứng PCR sử dụng mỗi 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 Kít 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 sẵn phẩm PCR kích thước 140 bp phát hiện bằng phản ứng PCR sử dụng mỗi 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 mỗi 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%).

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

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 gai mại âm 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"	12	4,87

	cao + nguy cơ thấp + chưa xác định nguy cơ"		
	Đa nhiễm genotype "nguy cơ thấp"	0	0
	Đa nhiễm genotype "chưa xác định nguy cơ thấp"	0	0

+ Từ 246 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%.

3.2.2.3. Một số yếu tố liên quan đến tình trạng đơn nhiễm và đa 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 $p=0,029$.

- Gái mại dâm không hút thuốc lá có nguy cơ nhiễm HPV cao hơn nhóm hút thuốc lá từ 1,4 - 3,6 lần ($p<0,0001$).

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

- 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*.

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	3	7	1	4	1	5
	3	0	6	9	7	0

	8	,	8	,	0	,
		6		7		5
Tế bào biểu mô biến đổi lành tính do viêm	7	5	3	0	3	9
	5	,	8	,	7	,
		7		7		3
Tế bào chuyển sản	4	9	2	9	1	0
	4	,	6	,	8	,
		2		1		9
ASC-US	5	,	0	0	5	0
		0				0
ASC-H	2	0	0	0	2	1
		,				0
		4				0
LSIL	1	2	1	7	1	9
	3	,		,	2	2
		7		7		3
HSIL	2	0	0	0	2	9
		,				2
		4				3

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 chuyển 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.

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

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			
					%	95% CI	P	
HPV DNA (+)					91	2,9 - 162,3	< 0,0001	
HPV DNA (-)					946			
HPV - 16					861	2,4 - 13,7	< 0,0001	
HPV-18					976	0,2 - 13,4	0,710	
HPV-26					1000		1,000	
HPV-31					933	0,0 - 5,3	0,511	
HPV-33					99	0,0	0,	

						0,9 - 1,9	232
HPV-35					778	0,0 - 0,8	0,060
HPV-39					828	1,8 - 15,6	0,0007
HPV-45					1000		1,000
HPV-51					852	1,3 - 13,4	0,0009
HPV-52					881	1,8 - 10,4	0,002
HPV-53					848	1,5 - 13,1	0,003
HPV-56					1000		1,000
HPV-58					961	0,3 - 5,3	1,000
HPV-59					950	0,1 - 7,1	1,000
HPV-66					885	0,9 - 1,2	0,100
HPV-68					88	1,6	0,

						2	-	0
						,	16,	1
						6	6	7
HPV-6						9	0,0	0,
						0	9 -	2
						,	2,0	5
						5		0
HPV-11						9	0,0	0,
						3	9 -	5
						,	5,6	3
						8		4
HPV-40						8	0,0	0,
						7	3 -	3
						,	2,8	1
						5		5
HPV-42						9	0,7	0,
						2	-	4
						,	4,9	8
						9		7
HPV-43						5	0,8	0,
						0	7 -	0
							11,	9
							2	0
HPV-44						0		0,
								0
								7
								0
HPV-54						8	0,0	0,
						8	4 -	3
						,	3,1	4
						9		7
HPV-61						1		1,
						0		0
						0		0
								0
HPV-70						1		1,
						0		0
						0		0
								0
HPV-81						1		1,
						0		0
						0		0
								0
HPV-30						8	0,0	0,

						1	4 -	0
						,	1,0	8
						8		6
HPV-34						8	0,0	0,
						4	5 -	1
						,	1,2	1
						6		6
HPV-62						1		1,
						0		0
						0		0
								0
HPV-90						1		1,
						0		0
						0		0
								0
HPV-91						1		1,
						0		0
						0		0
								0
HPV- JBE2						1		1,
						0		0
						0		0
								0
HPV- CP8304						8	0,0	0,
						8	7 -	1
						,	1,6	8
						2		1

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.

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

HIV	Dương tính	47	9,8	9	19,1	38	80,9	7,6	3,0 - 19,0
	Âm tính	432	90,2	13	3,0	419	97,0	1	
C. trachomatis	Dương tính	26	5,4	3	11,5	23	88,4	2,9	0,8 - 10,8
	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

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%).

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

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.

Yếu tố liên quan	Gái mại dâm		Xét nghiệm tế bào học				Phân tích đơn biến			
	n	%	Bất thường		Bình thường		OR	95% CI	p	
			N	%	N	%				
	≤ 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		
Tình trạng sản	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		

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 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 ($p < 0,0001$).

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 $p = 0,027$, 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.

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

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 môi 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. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với kết quả nghiên cứu của tác giả Hernandez 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 môi 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 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%, 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, đây là một trong những nguyên nhân dẫn tới tỷ lệ mắc UTCTC ở Việt Nam cao nhất trong khu vực Đông Nam Á.

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

Kết quả nghiên cứu 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.

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

ngĩa 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.

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).

Part A: INTRODUCTION

1. BACKGROUND

Genital human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted infection among women and the main cause of cervical cancer worldwide, the second most frequent cancer in women.

More than 200 types of HPV have been recognized on the basis of DNA sequence data showing genomic differences. Eighty-five HPV genotypes are well characterized. An additional 120 isolates are partially characterized potential new genotypes. HPVs can infect basal epithelial cells of the skin or inner lining of tissues and are categorized as cutaneous types or mucosal types. Cutaneous types of HPV are epidermitrophic and target the skin of the hands and feet. Mucosal types infect the lining of the mouth, throat, respiratory tract, or anogenital epithelium. Based on their association with cervical cancer and precursor lesions, HPVs can also be grouped to high-risk and low-risk HPV types. Low-risk HPV types include types 6, 11, 42, 43, and 44. High-risk HPV types include types 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, and 70.

HPV belongs to the family Papillomaviridae family. More than 200 types of HPV have been recognized on the basis of DNA sequence data showing genomic differences. One hundred distinct HPV genotypes are well characterized, and about 40 genotype have been identified in the mucosal epithelia of the human genital tract. High-risk HPV genotype cause to dysplasia and cancer that's belong to a few “high-risk” species of the mucosotropic alpha genus, These eight HPV genotype such as (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -45, -52, and -58) are observed most frequently and are responsible for about 90% of all cases of cervical cancer worldwide. In particular, HPV-16 and HPV-18 are observed in 70% of cervical cancer cases worldwide. However, circulating HPV types can vary by geography and ethnicity, and the current vaccine formulary for these two high-risk types is less effective against some other oncogenic HPV types.

In Vietnam, more than 6,000 new cases of cervical cancer and 3,000 cervical cancer—related deaths are estimated to occur each year. Cervical cancer ranks as the second most common cancer in women ages 15–45.

years. Unfortunately, most of cervical cancer patients were late diagnosis, although virus infected develop to cancer passed in long period.

2.OBJECTIVES

The research "Prevalence and genotype distribution of Human Papillomavirus among Female sex workers in Haiphong, Vietnam" were performed with these objectives:

- *To detect the prevalence of Human Papillomavirus infection and risk factors among Female sex workers in Haiphong, Vietnam.*
- *To identify the genotype distribution of HPV among Female sex workers.*
- *To assess the relationship between cervical cytology and genotype HPV.*

3. IMPERATIVE NEED, APPLYING MEANING

The information of genotype distribution of HPV vary by geography and ethnicity is necessary for vaccination program and implementation plan of HPV detection. However, screening for cervical cancer with the Pap smear test and HPV DNA detection are not available widely in Vietnam and population-based information on the distribution of HPV types among Vietnamese women is limited still.

This research was performed to identify the HPV genotype distribution among female sex workers, who are the main key of sexually transmitted disease, especially for HPV. Thus, research to detect HPV prevalence as well as to identify HPV genotype distribution among female sex workers are important trend worldwide.

The high technique were applied and well design research have done lead to best quality of research data and meaningful suggestion to vaccination program in Vietnam.

4. THESIS STRUCTURE

Exclude introduction and conclusion part, thesis have 4 chapters:

Chapter 1: General Background	28 pages
Chapter 2: Material and Method	23 pages
Chapter 3: Results	33 pages

Chapter 4: Discussion

38 pages

Thesis have: 18 tables, 20 images, 1 diagram và 3 appendix, 120 reference (111 English references, 9 Vietnamese references).

Part B: CONTENT

CHAPTER 1: GENERAL BACKGROUND

1. *Human Papillomavirus (HPV) characteristics.*

HPV belongs to family Papillomaviridae, The HPV genome consists of a single molecule of double-stranded, circular DNA . 2 divided genome regions: the early genes (E1 , E2 , E4 , E5 , E6 , E7) and the late genes (L1 , L2).

According ability to cause cancer , HPV is divided into 3 groups:

(1) HPV genotype group " low risk " (Low - risk type) : the genotype of HPV in this group only cause warts or benign tumors . The genomes are episomal forms exist, outside the circular DNA chromosomes owners . The HPV genotype in the " low risk " is common : HPV 6 , 11 , 40 , 42 , 43 , 44 , 54 , 61 , 70 , 72 , 81 , 89 and CP6108 .

(2) HPV genotype group " high risk " (High - risk type) : includes the ability to genotype HPV DNA integration into the genome , disrupt replication of the host cell , causing increased born and immortalized cells form malignant tumors . These genotypes potentially common cancer include HPV 16 , 18 , 31 , 33 , 35 , 39 , 45 , 51 , 52 , 56 , 58 , 59 , 68 , 73 , 82 and HPV 26 , 53 , 66.

(3) HPV genotype group " unknown risk " (Unknown - risk type) comprises the majority of the HPV genotype not identified as likely to cause cancer 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 .

HPV life cycle is closely related to the host epithelial cells , is divided into 4 stages including stage invasive potential phase , stage and phase replication powerful liberation .

Mechanism of HPV disease including stage penetration of HPV gene sequences into the host cell , causing immortalized cells , causing genetic instability host cell , causing changes in response to DNA damage and causes proliferation and cell differentiation .

2. HPV molecular diagnostic methods including:

- Hybridization methods
- Polymerase Chain Reaction method (PCR)
- Real-time PCR
- DNA microarray
- Sequencing

3. HPV infection in Vietnam and in the world

According to the report of the International Agency for Research on Cancer (IARC), there are approximately 6.6% of women worldwide aged 15 to 74 are infected with HPV and about 80% of women infected with HPV at least one times during their sexual life.

In Vietnam, the prevalence of HPV infection in female vary from 2% to 10.9% by geographic.

CHAPTER 2: MATERIAL AND METHODS

1. Participants - subjects

Participants include 479 female sex workers controlled in Thanh Xuan centre – Haiphong city.

2. Research design

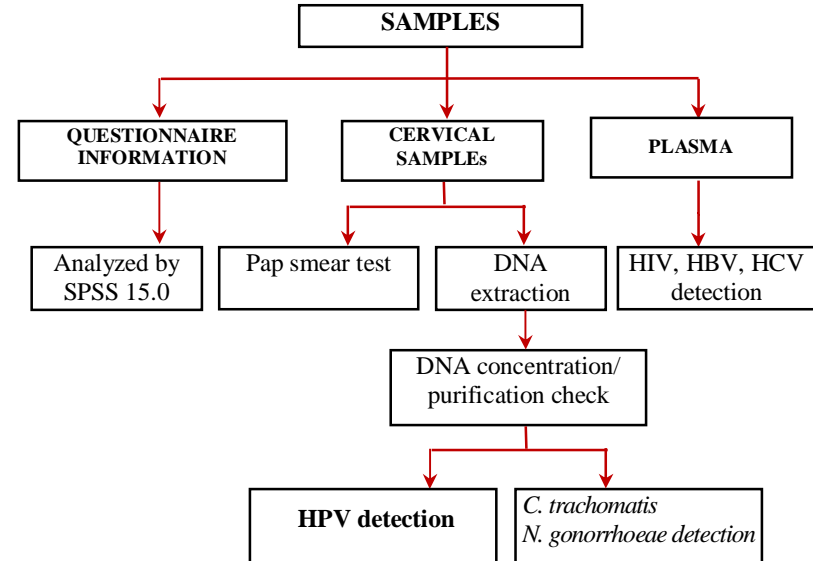
A cross-sectional survey was be done with number of participants base on following form:

$$n = z^2(1-p)/pd^2$$

3. Samples collection

A gynecological examination was performed, and two cervical-swab samples were collected using a cervical brush (Honest Uterine Cervical Brushes; Honest Medical, Tokyo, Japan). The cervical swabs were smeared onto a slide, fixed with alcohol solution (Rapid Fix; Muto, Tokyo, Japan), and stained according to standard procedures for the Pap smear test. The remainder of each sample was suspended in 1 ml of lysis buffer (TBE buffer, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 2% SDS) and stored at -80°C until use. Sociodemographic information was collected using questionnaires. Blood samples were collected and plasma samples stored at -80°C until use. The study protocol was reviewed and approved by the

ethics committees of Hanoi Medical University, Vietnam, and Kanazawa University, Japan.



Amplified L1 HPV by PCR using GP5+/GP6+ original and GP5+/GP6+ modified primers

HPV DNA (+)

HPV Genotyping

GeneSquare HPV Typing DNA Microarray Kit

HPV Genotype fail

HPV Genotyping

analyse diagram

1. HPV DNA detection

- Using GP5+/GP6+ original primers
- Cloning - Sequenced and Gene analyse

Mixture	Volume
---------	--------

	(μ l)
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
DNA extraction products	5
Total	50 μ l

Temperature condition:

94°C	10 minutes	} 45 cycles
94°C	45 seconds	
48°C	4 seconds	
38°C	30 seconds	
42°C	5 seconds	
66°C	5 seconds	
71°C	90 seconds	
72°C	10 seconds	
4°C	Pause	

• Using GP5+/GP6+ modified primers

Mixture	Volume (μ l)
H ₂ O	24,5
10x Buffer	5
2mM dNTP	5
25mM MgCl ₂	7
20mM GP5+	0,5
M1-2	
20mM GP5+	0,5
M2-2	
20mM GP5+	0,5
M3-2	
20mM GP6+	0,5
M1-2	
20mM GP6+	0,5
M2-2	
20mM GP6+ M3	0,5
Ampli Taq Gold	0,5
DNA tách chiết	5
Tổng thể tích	50 μ l

Temperature condition:

95°C	10 minutes	} 45 cycles
95°C	30 seconds	
45°C	30 seconds	
74°C	30 seconds	
74°C	10 minutes	
4°C	Pause	

2. HPV Genotype methods

- **DNA microarray method** (GeneSquare HPV Typing DNA Microarray Kit):
 - + HPV DNA amplified by multiplex PCR.
 - + DNA single strain hybridization.
 - + Analyse results.
- **Cloned sequencing method**
 - + HPV DNA gene inserted and transfer to DNA plasmid of competency *E.coli* InVαF' strain.
 - + Inserted check by PCR to amplify *lacZα* gene of *pCR^{2.1}* vector.
 - + *E.coli* content DNA plasmid were growing up over night.
 - + DNA plasmid extraction and purification.
 - + Sequencing and analyzing data.
 - + Genotyping by data upload compared with geneBank data.

3. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS Version 15.0 for Windows.

4. Ethical approve

The research was approved by the ethics committees of Hanoi Medical University, Vietnam, and Kanazawa University, Japan.

CHAPTER 3: RESULTS

3.1. HPV infection prevalence among female sex workers in Haiphong and risk factors

3.1.1. HPV infection prevalence among female sex workers in Haiphong

Among 479 samples analysed, 246 samples were found PCR product which have 140 bp gene fragments (HPV DNA positive) using GP5+/GP6+ original and 246 HPV DNA positive samples using GP5+/GP6+ modified . HPV infection prevalence among female sex workers in Haiphong, Vietnam detected by PCR using GP5+/GP6+ original is 51,4% and GP5+/GP6+ modified primers are 51,1%.

3.1.2. Risk factors associated to HPV infection among female sex workers in Haiphong

Table 3.4. Multiples analysis logistic data of Risk factors significantly associate with HPV infection

associate with HPV infection		workers						
		n	%	OR	95% CI	p	OR	95% CI
Age (years)	≤ 25	233	48,6	2,02	1,4 - 2,9	< 0,0001	1,9	1,3 - 3,0
	> 25	246	51,4		1			
Marital Status	Single	247	51,6	1,8	1,0 - 3,2	0,046	1,0	0,6 - 1,7
	Co-habitant	62	12,9		1		0,78	0,4 - 1,4
	Divorced, Separated, Widowed	170	35,5	1,5	0,99 - 2,2	0,058		
Smoking	Non	333	69,5	2,1	1,4 - 3,1	< 0,0001	2,5	1,6 - 3,9
	Yes	146	30,5		1			
Pregnant history	Not yet	134	28,0	1,6	1,05 - 2,4	0,032	1,1	0,6 - 1,8
	Yes	345	72,0		1			
HIV	Positive	47	9,8	4,5	2,1 - 9,5	< 0,0001	7,9	3,5 - 17,6
	Negative	432	90,2		1			
<i>C.trachomatis</i>	Positive	26	5,4	2,7	1,1 - 6,5	0,027	2,4	0,9 - 5,9
	Negative	453	94,6		1			

Comments:

Multivariate analysis using Stepwise function to detect risk factors related to HPV infection which were significantly associated in single analysis (Years, Marital status, Smoking history, Pregnant history, HIV infection and *C.trachomatis* infection) suggest that:

+ HPV infection have relationship to some independent risk factors such as: years, smoking history and HIV infection history.

+ Marital status, pregnant history and *C.trachomatis* infection were found as dependent risk factors (Results variates) of HIV infections.

3.2. HPV genotype distribution among female sex workers in Haiphong

factors significantly	Female sex	Single analysis	Multiple analysis
-----------------------	------------	-----------------	-------------------

3.2.1. HPV genotyping detection results using DNA microarray and cloned-sequencing.

3.2.1.1. HPV genotyping detection results using DNA microarray

Among 246 HPV DNA positive samples, 229 were HPV genotyping detected and 17 samples couldn't detected HPV genotype by DNA microarray chip (DNA microarray) using Kit GeneSquare HPV Typing DNA Microarray. Thus, these 17 samples of HPV DNA positive but couldn't detected HPV genotype need to continuous HPV genotyping by cloned-sequencing.

3.2.1.2. HPV genotyping detection results using cloned-sequencing

No	Patient ID	HPV DNA	Cloned-sequencing results
18.	HPC-005-09	Positive	HPV-26, HPV-62
19.	HPV-2-024	Positive	HPV-81
20.	HPV-2-043	Positive	HPV-JBE2
21.	HPV-2-045	Positive	HPC-70
22.	HPV-2-068	Positive	HPV-90 (JC9710)
23.	HPV-2-087	Positive	HPV-70
24.	HPV-2-090	Positive	HPV-81
25.	HPV-2-125	Positive	HPV-CP8304
26.	HPV-2-138	Positive	HPV-26
27.	HPV-2-171	Positive	HPV-JBE2
28.	HPV-2- 209	Positive	HPV-70, HPV-81
29.	FSW-10-045	Positive	HPV-CP8304
30.	FSW-10-095	Positive	HPV-90
31.	FSW-10-125	Positive	HPV 81
32.	FSW-10-178	Positive	Human/bacteria gene
33.	FSW-10-195	Positive	HPV-90
34.	FSW-10-201	Positive	HPV-CP8304

Comments:

+ Among 17 cloned samples, 100% were successfully sequencing and of them, 16/17 were HPV genotyping and 01 were detected that 140 bp of PCR product using GP5+/GP6+ original was not HPV DNA.

+ All of HPV genotyping successfully by cloned-sequencing are genotype were not present in DNA chip of Kit GeneSquare HPV Typing DNA Microarray. HPV genotype were detected by cloned-sequencing belongs to Low-risk and Unknow-risk group.

Thus, of 246 HPV DNA positive samples which were detected by PCR using GP5+/GP6+ original and 245 HPV DNA positive samples which were detected by PCR using GP5+/GP6+ modified primers, 245 samples were confirmed that the gene fragments amplified are HPV DNA and 01 sample were detected that 140 bp of PCR product using GP5+/GP6+ original was not HPV DNA. The HPV infection prevalence among female sex workers in Haiphong 51,1%.

3.2.2. Distribution and Multiple infection HPV genotype

3.2.2.1. HPV genotype distribution

Table 3.6. HPV genotype distribution among female sex workers in Haiphong

TT	Group	Genotype	Strains	%
34.	High-risk group	HPV-16	79	12,53
35.		HPV-18	41	6,50
36.		HPV-26	1	0,15
37.		HPV-31	15	2,38
38.		HPV-33	20	3,17
39.		HPV-35	9	1,42
40.		HPV-39	29	4,60
41.		HPV-45	8	1,26
42.		HPV-51	27	4,28
43.		HPV-52	84	13,33
44.		HPV-53	33	5,23
45.		HPV-56	12	1,90
46.		HPV-58	51	8,09
47.		HPV-59	20	3,17
48.		HPV-66	26	4,12

49.		HPV-68	23	3,65
	Total		478	75,87
50.	Low-risk group	HPV-6	21	3,33
51.		HPV-11	16	2,53
52.		HPV-40	8	1,26
53.		HPV-42	14	2,22
54.		HPV-43	2	0,31
55.		HPV-44	2	0,31
56.		HPV-54	9	1,42
57.		HPV-61	9	1,42
58.		HPV-70	5	0,79
59.		HPV-81	18	2,85
		Total		104
60.	Unknow risk group	HPV-30	11	1,74
61.		HPV-34	13	2,06
62.		HPV-62	1	0,15
63.		HPV-90	2	0,31
64.		HPV-91	1	0,15
65.		HPV-JBE2	3	0,47
66.		HPV-CP8304	17	2,69
	Total		48	7,63

Comments:

+ Of 246 HPV DNA positive samples, 33 genotype and 630 HPV strains were detected. HPV detected strains including:

- 478 strains of High-risk HPV genotype: 75,87% (478/630).

- 104 strains of Low-risk HPV genotype: 16,5% (104/630).

- 48 strains of Unknow-risk HPV genotype: 7,63% (48/630).

+ Of 33 HPV genotype HPV detected, HPV 52 is the most common genotype, count for 13,33% (84/630 strains), next to is HPV 16 with 12,53% (79/630 strains) and HPV 58 are 8,09% (51/630 strains). HPV 18 were found 41 strains, with 6,5%.

HPV 6 and HPV 11 count for 3,33% and 2,53%.

3.2.2.2. Single infection and Multiples infection HPV genotype

Table 3.7. Single infection and Multiples infection HPV genotype among female sex workers in Haiphong

Single and Multiples infection HPV	n	%
------------------------------------	---	---

genotype			
Single infection		79	32,11
	Single high-risk HPV genotype	54	21,96
	Single low-risk HPV genotype	18	7,31
	Single Unknow-risk HPV genotype	7	2,84
Multiples infection		167	67,89
	Multiple high-risk HPV genotypes	75	30,5
	Multiple high and low risk HPV genotypes	60	24,39
	Multiple high and unknow-risk HPV genotypes	20	8,13
	Multiple high, low and unknow-risk HPV genotypes	12	4,87
	Multiple low-risk HPV genotypes	0	0
	Multiple Unknow-risk HPV genotypes	0	0

Comments:

+ Among 246 HPV infected cases, 79 were single HPV genotype infection (32,11%) and 167 were multiple HPV genotype infection (infected ≥ 2 HPV genotype) count for 67,89%.

3.2.2.3. Risk factors associated with single and multiples infection HPV genotype

- Female sex workers divorced, separated or widowed have multiple HPV genotypes infection risk 1,6 time higher than who were co-habiting with husband or sex partners. The diferency is significant associated with p value =0,029.

- Female sex workers who have smoking history could have multiple HPV genotypes infection risk 1,6 time higher than who have none of smoking history with OR from 1,4 to 3,6 (p<0,0001).

- HIV infection significant associated with single HPV genotype infection (p=0,006) and multiple HPV genotypes infection (p=0,037).
- *C.trachomatis* significant associated (p=0,018) with multiple HPV genotypes infection. Female sex workers infected with *C.trachomatis* have multiple HPV genotypes infection risk 2,7 time higher than who are not infected with *C.trachomatis*.

3.3. The relationship between cervical cytology and HPV genotype.

3.3.1. Cervical cytology results among female sex workers in Haiphong

Table 3.14. Cervical cytology results among female sex workers in Haiphong

Cervical cytology results	Female sex workers		HPV DNA			
			Negative		Positive	
	n	%	n	%	n	%
Negative for Intraepithelial lesion or malignancy	338	70,6	168	49,7	170	50,3
Squamous cell change associated inflammation	75	15,7	38	50,7	37	49,3
Dysplasia	44	9,2	26	59,1	18	40,9
ASC-US	50	10,4	0	0,0	50	100,0
ASC-H	20	4,2	0	0,0	20	100,0
LSIL	137	28,7	17	12,4	120	87,6

						3
HSIL	2	0,4	0	0,0	0	0,0
						2
						3

Among 479 cervical cytology samples test, 338 (70,6%) samples have Negative for Intraepithelial lesion or malignancy, 75 cases Squamous cell change associated inflammation, 44 dysplasia cases and 22 were abnormal cervical cytology including 5 cases Atypical squamous cell of undetermined significance, 2 cases Atypical squamous cell cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion, 13 cases low-grade squamous intraepithelial lesion, 2 cases high-grade squamous intraepithelial lesion. None of cervical cancer case was found among female sex workers in Haiphong.

3.3.2. The relationship between cervical cytology and HPV genotype

Table 3.15. The relationship between cervical cytology and HPV genotype

HPV	Female sex workers		Cervical cytology		Single analysis			
			Abnormal	Normal				
				%		OR	95% CI	P
HPV DNA (+)			89	9,2	9	2,1	2,9 - 162,3	< 0,001
HPV DNA (-)			0	0,0	9	1,6		
HPV -16			13	1,3	8	5,6	2,4 - 13,7	< 0,0

				,		7			00
				9					1
HPV-18				2	9	2	0,2	0,7	
				,	7	,	-	10	
				4		0	13,4		
HPV-26				0	1			1,0	
					0			00	
HPV-31				6	9	0	0,08	0,5	
				,	3	,	- 5,3	11	
				7		7			
HPV-33				1	9	0	0,09	0,2	
				0	0	,	- 1,9	32	
				0		4			
HPV-35				2	7	0	0,03	0,0	
				2	7	,	- 0,8	60	
				2		2			
HPV-39				1	8	5	1,8 -	0,0	
				7	2	,	15,6	07	
				,		3			
				2	8				
HPV-45				0	1			1,0	
					0			00	
HPV-51				1	8	4	1,3 -	0,0	
				4	5	,	13,4	29	
				,		2			
				8	2				
HPV-52				1	8	4	1,8 -	0,0	
				1	8	,	10,4	02	
				,		3			
				9	1				
HPV-53				1	8	4	1,5 -	0,0	
				5	4	,	13,1	13	

				,		5			
				2					
HPV-56				0	1			1,0	
					0			00	
HPV-58				3	9	1	0,3 -	1,0	
				,	6	,	5,3	00	
				9		2			
HPV-59				5	9	0	0,1 -	1,0	
				,	5	,	7,1	00	
				0		9			
HPV-66				1	8	0	0,9 -	0,1	
				1	8	,	1,2	10	
				5		3			
HPV-68				1	8	5	1,6 -	0,0	
				7	2	,	16,6	17	
				,		1			
				4	6				
HPV-6				9	9	0	0,09	0,2	
				,	0	,	- 2,0	50	
				5		4			
HPV-11				6	9	0	0,09	0,5	
				,	3	,	- 5,6	34	
				3		7			
HPV-40				1	8	0	0,03	0,3	
				2	7	,	- 2,8	15	
				,		3			
				5	5				
HPV-42				7	9	0	0,7 -	0,4	
				,	2	,	4,9	87	
				1		6			
HPV-43				5	5	0	0,87	0,0	

Sepatated, Widowed									
None	333	69,5	16	4,8	317	95,2	0,84	0,3 - 2,2	
Yes	146	30,5	6	4,1	140	95,9	1		
Yes	345	72,0	15	4,3	330	95,7	1,2	0,5 - 3,0	
Not yet	134	28,0	7	5,2	127	94,8	1		
Positive	47	9,8	9	19,1	38	80,9	7,6	3,0 - 19,0	
Negative	432	90,2	13	3,0	419	97,0	1		
Positive	26	5,4	3	11,5	23	88,4	2,9	0,8 - 10,8	
Negative	453	94,6	19	4,2	434	95,8	1		

Comments:

- + Years, marital status, smoking history, pregnant history and *C. trachomatis* infection significant associated with HPV infection however those are not significant associated with cervical cytology changement.
- + HIV infection significant associated with HPV infection as well as with abnormal cervical cytology changement. The differency significant associated with abnormal cervical cytology changement between infected and uninfected HIV with $p < 0,0001$.

CHAPTER 4: DISCUSSION

4.1. HPV infection prevalence among female sex workers in Haiphong and risk factors

4.1.1. HPV infection prevalence among female sex workers in Haiphong

The prevalence of HPV infection among female sex workers in Haiphong in this research is similar with HPV infection prevalence among female sex workers in some other neighbour countries such as Kyoto - Japan (52,6%), Manila - Philippine (57,2%); PhnomPenh - Campuchia (41,1%) but higher than HPV infection prevalence among female sex workers in capital Singapore of Singapore (14,4%); Songkla – Thailand (22,9%); Bali - Indonesia (38,3%); Guangxi province, south of China (38,9%). However, The prevalence of HPV infection among female sex workers in Haiphong are clearly lower than HPV infection prevalence among female sex workers in Dhaka - Bangladesh (75,8%), Bengal - India (73,3%) and tai Huzhou province, south of China (66,7%).

4.1.2. Risk factors associated to HPV infection among female sex workers in Haiphong

The relationships between years and HPV infection among female sex worker in Haiphong show that, the years was strong significant associated with HPV infection and highest prevalence in age younger than 25 years old, higher aproximately 2 times compared with HPV prevalence in age older than 25 years. This finding suggest that the prevalence of HPV infection in Haiphong was similar with other countries worldwide.

The prevalence of HIV infection was detected in 9,8% female sex workers cases and most of HIV infected cases have coinfections with HPV (80,9%). The single analysis and multiple analysis data using Stepwise function show that the HPV infection was significant associated with HIV infection and HIV infection was independent risk factor of HPV infection. The clearly differency of HPV infection prevalence between infected and uninfected with HIV, female sex workers infected with HIV have higher HPV infection risk, about 7,9 times than other ($p < 0,0001$).

The significantly relationship of *C.trachomatis* in this research also similar with published results of previous researchs. female sex workers infected with *C.trachomatis* have higher HPV infection risk, about 2,7 times than uninfected group ($p=0,027$). However, multiple analysis data in table 3.4 show that *C.trachomatis* was not independent factor of HPV infection.

4.2. HPV genotype distribution among female sex workers in Haiphong

Compared with some other research on HPV genotype distribution in Vietnam, the results in this research were different. In previous research, HPV genotype were detected by PCR using GP5+/GP6+ original primers and by enzyme immunoassay. Phạm Thị Hoàng Anh et al were performed research in 2003 on 994 women aged from 15 to 65 in Northern Vietnam and 922 women in HoChiMinh city, Southern Vietnam, this previous results found that HPV 16 is the most common genotype in Vietnam, the next is HPV 58, 18 and HPV 56. However, the results in our research was similar with results published by Hernandez in 2008, which was show that HPV 52 is the most common HPV genotype among 282 female sex workers in SocTrang, southern Vietnam by Reverse line blot detection using PCR products which were amplified by GPMY09/GPMY11 primers (Roche Molecular Systems). Those different finding about HPV genotype distribution in same area may caused by different HPV genotyping method. In this research, the multiple genotypes infection among female sex workers in Haiphong was more popular, count for 67,89%. Among them, all of female sex workers were infected with at least one high-risk HPV genotype. According to report of WHO about HPV infection in Vietnam, HPV infection prevalence in over country was 5,4%, among them 41,6% of cases infected with at least two HPV genotypes. This finding suggest that, the HPV prevalence in Vietnam is lower than HPV prevalence in some other countries (10,1%) but most of HPV infected cases in Vietnam were multiple HPV genotypes infection. The multiple HPV genotypes infection is HPV persistent risk and cervical change. In addition, HPV DNA detection methods, HPV genotyping methods as well as cervical cancer screening in Vietnam still limited. These may the causes due to prevalence

of cervical cancer in Vietnam is highest prevalence compare with other countries in South-East Asia.

4.3. The relationship between cervical cytology and HPV genotype.

The cervical cytology results in this research show the strongly difference of HPV infection prevalence between normal and abnormal cervical cytology groups. In normal cervical cytology group (Negative for Intraepithelial lesion or malignancy, **Squamous cell change associated inflammation and dysplasia cells**), **the prevalence of HPV DNA negative and positive were similars**. However, in abnormal cervical cytology group (ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL), most of cases were infected with HPV. This finding suggest the effect of HPV on cervical cytology change.

Compare the variants of E6/E7 HPV 16 and HPV 52 among female sex workers in Haiphong and variants of E6/E7 HPV 16 and HPV 52 in Phillipine as well as in Japan, these two neighbour countries have similar HPV genotype distribution, the variants show the difference strains of HPV-16 and HPV-52 lead to different effect on cervical cell. This finding also suggest the vaccin implementation plan as well as cervical cancer screening in country.

Low-risk and Unknow-risk HPV genotypes are not significant associated with cervical cytology change were also finding in this research.

CONCLUSIONS

1. HPV infection prevalence among female sex workers in Haiphong and risk factors

1.1. The prevalence of HPV infection among female sex workers in Haiphong, Vietnam was 51,1%.

1.2. The prevalence of HPV infection among female sex workers in Haiphong significantly associated with age, marital status, smoking history, pregnant history, coinfection with HIV and *C. trachomatis*.

2. HPV genotype distribution among female sex workers in Haiphong

2.1. 33 genotype HPV were detected. High-risk HPV genotype HPV were found in most of cases (75,87%), low risk HPV genotype were found in 16,5% and unknow-risk HPV genotype were found in 7,63%.

HPV 52 is most common genotype (13,33%), next to HPV 16 (12,53%) and HPV 58 found in 8,09% cases. HPV 18 detected in 6,5%.

2.2. Single HPV genotype infection among female sex workers in Haiphong was 32,11% and multiple HPV genotypes infection was found in 67,89%.

3. The relationship between cervical cytology and HPV genotype.

3.1. The cervical cytology results (Pap smears test) found that: 70,6% cases were normal cervical cytology (Negative for Intraepithelial lesion or malignancy); 15,7% of cases Squamous cell change associated inflammation; 9,2% dysplasia cells), 4,5% cases were abnormal cervical cytology (ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL). Nove of case was cervical cancer among female sex workers in Haiphong was found.

3.2. The cervical cytology changement significantly associated with High-risk HPV genotype infection (HPV-16, HPV-39, HPV-51, HPV-52, HPV-53 and HPV-68).