

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR VÀ REVERSE DOT-BLOT XÁC ĐỊNH TYPE HPV CÓ NGUY CƠ GÂY UNG THƯ CỔ TỬ CUNG

Phan Văn Bảo Thắng¹, Nguyễn Hoàng Bách¹, Nguyễn Văn Thành²,
Trần Thị Như Hoa¹, Ngô Viết Quỳnh Trâm¹

(1) Trường Đại học Y Dược Huế

(2) Trường Trung học Quốc học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Nhiễm trùng HPV là nguyên nhân chính gây ung thư cổ tử cung (UTCTC). Phát hiện HPV và xác định type HPV giúp chẩn đoán, điều trị hợp lý và tiên lượng các trường hợp viêm/UTCTC. **Mục tiêu:** Xác định tỷ lệ các type HPV có nguy cơ gây UTCTC và các loại hình nhiễm type HPV. **Phương pháp:** 177 mẫu dịch cổ tử cung được lấy từ bệnh nhân được chẩn đoán viêm hoặc có bất thường ở kết quả phết tế bào cổ tử cung tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược. Thực hiện kỹ thuật real-time PCR phát hiện nhiễm HPV và kỹ thuật reverse Dot-Blot xác định genotype HPV từ những mẫu PCR dương tính. **Kết quả:** 7 type HPV nguy cơ cao được xác định, thường gặp nhất là type 18 (74,6%) và type 16 (37,6%). Loại hình đơn nhiễm chiếm 30,4% và đa nhiễm chiếm tỷ lệ cao hơn (69,6%), trong đó đồng nhiễm 2 và 3 type HPV thường gặp nhất (32,2% và 20,3%). **Kết luận:** Phối hợp kỹ thuật real-time PCR và reverse Dot-Blot cho phép xác định type HPV nguy cơ cao gây UTCTC và các loại hình nhiễm HPV.

Từ khóa: reverse DOT-BLOT, real-time PCR, PCR, ung thư cổ tử cung, type HPV

Abstract

APPLICATION OF REAL-TIME PCR TECHNIQUE AND REVERSE DOT-BLOT FOR DETECTION THE HIGH RISK TYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS CAUSING CERVICAL CANCER

Phan Van Bao Thang¹, Nguyen Hoang Bach¹, Nguyen Van Thanh²,
Tran Thi Nhu Hoa¹, Ngo Viet Quynh Tram¹

(1) Hue University of Medicine and Pharmacy

(2) Quoc Hoc High School, Hue City

Introduction: Infection with HPV is the main cause of cervical cancer. Determining HPV infection and the types of HPV plays an important role in diagnosis, treatment and prognosis of cervicitis/cervical cancer. **Aims:** Determining proportion of high-risk HPV types and the occurrence of coinfection with multiple HPV types. **Methods:** 177 women with cervicitis or abnormal Pap smear result were enrolled in the study. Performing the real-time PCR for detecting HPV and the reverse DOT-BLOT assay for determining type of HPV in cases of positive PCR. **Results:** 7 types of high-risk HPV was detected, the majority of these types were HPV type 18 (74.6%) and HPV type 16 (37.6%); the proportion of infection with only one type of HPV was 30.4% and coinfection with multiple HPV types was higher (69.6%), the coinfecting cases with 2 and 3 types were dominated (32.2% and 20.3%, respectively) and the coinfecting cases with 4 and 5 types were rare. **Conclusion:** Use of the real-time PCR and reverse DOT-BLOT assay can determine the high-risk HPV types and the occurrence of coinfection with multiple HPV types.

Key words: HPV type, Reverse DOT-BLOT, real-time PCR, PCR, cervical cancer

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

HPV là tác nhân virus gây nhiễm trùng đường sinh dục thường gặp nhất. HPV được xác định là nguyên nhân gây ung thư cổ tử cung (UTCTC) và các tiền thương tổn của chúng. Dựa vào kiểu gen,

HPV được chia thành hai nhóm nguy cơ gây UTCTC: nhóm HPV có nguy cơ cao và nhóm HPV có nguy cơ thấp, nhiễm HPV type có nguy cơ cao là nguyên nhân chủ yếu dẫn đến ung thư cổ tử cung, trong số hơn 200 type HPV khác nhau đã được xác định,

- Địa chỉ liên hệ: Ngô Viết Quỳnh Trâm, email: qtramnv@gmail.com

DOI: 10.34071/jmp

3 5

- Ngày nhận bài: 20/5/2017; Ngày đồng ý đăng: 12/6/2017; Ngày xuất bản: 18/7/2017

các type có nguy cơ gây ung thư cao phổ biến là 16, 18, 33, 45, 56 và 58 [1] currently consisting of 79 fully characterized human PV (HPV. Nghiên cứu của Ibeanu đã ước lượng tần suất nhiễm HPV trong các trường hợp UTCTC trên toàn thế giới lên đến 95% [2]. Tỷ lệ nhiễm HPV ở phụ nữ thành phố Hồ Chí Minh là 8,34% [3]. Tỷ lệ nhiễm ở trường hợp có tổn thương tế bào cổ tử cung từ ASCUS trở lên ở thành phố Hồ Chí Minh là 73,6% [4] và ở Huế là 55,4%.

Phát hiện HPV và xác định type HPV giúp chẩn đoán, điều trị hợp lý và tiên lượng các trường hợp viêm/ung thư cổ tử cung. Hiện nay có nhiều phương pháp xác định genotype HPV như kỹ thuật real-time PCR đa mồi, PCR phối hợp với kỹ thuật lai DNA, giải trình tự gen (sequencing), Hybrid Capture II ... Việc lựa chọn một phương pháp để thực hiện, rẻ tiền và có thể phát hiện được đồng thời nhiều type HPV có nguy cơ cao gây UTCTC có ý nghĩa quan trọng. Kỹ thuật Hybrid Capture II và PCR phối hợp kỹ thuật lai DNA được cho là kỹ thuật có độ nhạy cao tương đương [5]. Với những trang thiết bị về kỹ thuật sinh học phân tử sẵn có tại phòng thí nghiệm của bộ môn Vi sinh, chúng tôi thực hiện đề tài này bằng phối hợp kỹ thuật real-time PCR với kỹ thuật lai DNA nhằm hai mục tiêu sau:

- Xác định tỷ lệ các type HPV có nguy cơ gây ung thư cổ tử cung.
- Xác định các loại hình nhiễm type HPV.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: 177 mẫu dịch cổ tử cung được lấy từ bệnh nhân được chẩn đoán viêm hoặc có bất thường ở kết quả phết tế bào cổ tử cung, tại khoa Sản, bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế.

+	61	18	45	58
6	70	31	51	59
11	71	33	52	66
42	81	35	53	68
43	16	39	56	82

2.2. Phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu mô tả cắt ngang.

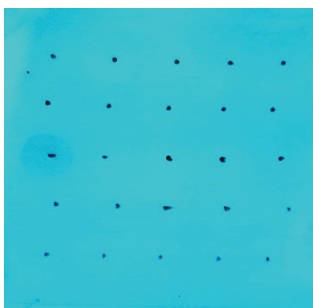
2.3. Tiến hành

- Bệnh phẩm: dịch cổ tử cung được lấy ở phòng khám Sản phụ khoa bằng que tăm bông vô trùng, cho vào ống Eppendorf 1,5ml chứa 400μl đệm TE rồi chuyển đến phòng xét nghiệm Vi sinh, bảo quản ở -20°C cho đến khi thực hiện kỹ thuật.

- *Tách chiết DNA:* mẫu bệnh phẩm được tan đông ở nhiệt độ phòng, lắc trộn đều trên máy vortex BioRad, lấy 200μl và tách chiết DNA với bộ kit LightPower^{NA} pDNA Extraction Kit (Công ty Cổ phần Công nghệ Việt Á).

- *Thực hiện kỹ thuật real-time PCR phát hiện HPV:* lấy 5μl DNA đã tách chiết của mỗi mẫu bệnh phẩm cho vào dung dịch phản ứng của bộ kit LightPower^{NA} HPV Genotype rPCR (Công ty Cổ phần Công nghệ Việt Á) để thực hiện kỹ thuật PCR theo nguyên lý dùng mẫu dò TaqMan đặc hiệu cho HPV như quy trình hướng dẫn, thực hiện trên máy real-time PCR Mx3000 (Stratagene, Hoa Kỳ).

- *Thực hiện kỹ thuật reverse Dot-Blot xác định genotype HPV:* sản phẩm PCR có kết quả dương tính với HPV được sử dụng để tiến hành kỹ thuật lai DNA với các đầu dò DNA đặc hiệu cho các kiểu gen HPV (được gắn sẵn trên màng lai ở các vị trí đánh dấu như hình bên) theo quy trình của bộ kit LightPower^{NA} HPV Genotype PCR-RDB (Công ty Cổ phần Công nghệ Việt Á) để xác định kiểu gen. Với bộ kit này sẽ phát hiện được 16 kiểu gen HPV có nguy cơ cao: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 81 và 8 kiểu gen HPV có nguy cơ thấp: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 79. Kết quả dương tính khi thấy có chấm xanh xuất hiện trên màng lai, tương ứng với vị trí nào là genotype đó (Hình 1)



Hình 1. Vị trí kiểu gen HPV tương ứng trên màng lai và kết quả dương tính với genotype 6

- Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 16.0.

3. KẾT QUẢ

Thực hiện kỹ thuật real-time PCR phát hiện HPV cho 177 mẫu dịch cổ tử cung của bệnh nhân viêm hoặc loạn sản cổ tử cung và kỹ thuật reverse Dot-Blot xác định type HPV trên mẫu nghiệm PCR dương tính, chúng tôi có được kết quả như sau:

3.1. Tỷ lệ HPV dương tính được phát hiện bằng kỹ thuật PCR

Bảng 1. Tỷ lệ HPV dương tính

HPV	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Dương tính	59	33,3
Âm tính	118	66,7
Tổng cộng	177	100,0

Trong 177 mẫu dịch cổ tử cung được làm PCR phát hiện nhiễm HPV, tỷ lệ dương tính là 33,3%.

3.2. Tỷ lệ các type HPV được xác định ở các mẫu PCR dương tính

Bằng kỹ thuật reverse DOT BLOT, chúng tôi đã xác định được 9 type HPV khác nhau trong số 59 mẫu PCR dương tính với HPV, gồm các loại hình đơn nhiễm và đa nhiễm, trong đó có 2 type HPV thuộc nhóm có nguy cơ gây UTCTC thấp và 7 type HPV thuộc nhóm có nguy cơ cao. Trong nhóm HPV có nguy cơ cao, type HPV hay gặp nhất là type 18 (74,6%) và type 16 (37,3%); type HPV 6 có nguy cơ thấp chiếm tỷ lệ cao thứ hai trong tất cả 9 type được xác định (66,1%) và type 11 chiếm tỷ lệ 23,7%.

Bảng 2. Tỷ lệ các type HPV được xác định

Type HPV có nguy cơ gây UTCTC Số lượng (n)		HPV dương tính (N = 59)	
		Tỷ lệ (%)	
<i>thấp</i>	6	39	66,1
	11	14	23,7
<i>cao</i>	16	22	37,3
	18	44	74,6
	33	3	5,1
	39	1	1,7
	51	1	1,7
	52	11	18,6
	58	4	6,8

3.3. Sự phân bố các loại hình nhiễm HPV

Bảng 3. Tỷ lệ các loại hình đơn nhiễm và đa nhiễm HPV

HPV	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Đơn nhiễm	18	30,5
Đa nhiễm	41	69,5
Tổng cộng	59	100,0

Trong số 59 mẫu HPV dương tính, có 18 mẫu (30,5%) chỉ nhiễm 1 type HPV và có đến 41 mẫu (69,5%) nhiễm đồng thời nhiều type HPV khác nhau.

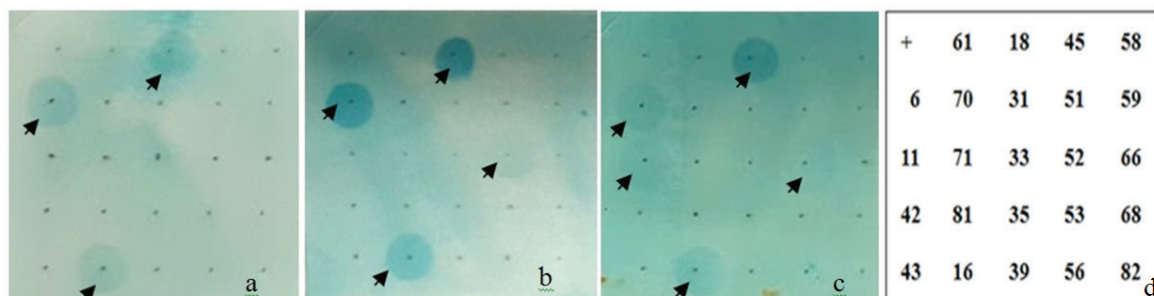
Bảng 4. Tỷ lệ các type HPV theo loại hình đơn nhiễm và đa nhiễm

Nguy cơ gây UTCTC	Type HPV	Đơn nhiễm (N=18)		Đa nhiễm (N=41)	
		n1	%	n2	%
<i>thấp</i>	6	5	27,8	34	82,9
	11	3	16,7	11	26,8
<i>cao</i>	16	2	11,2	20	48,8
	18	5	27,8	39	95,1
	33	1	5,6	2	4,9
	39	0	-	1	2,4
	51	1	5,6	0	-
	52	0	-	11	26,8
	58	1	5,6	3	7,3

Trong loại hình đơn nhiễm HPV6 và type 18 chiếm tỷ lệ cao nhất (đều chiếm tỷ lệ 27,8%), các type HPV nguy cơ gây UTCTC chiếm 55,6%. Trong loại hình đa nhiễm HPV, hầu hết các trường hợp đều nhiễm type có nguy cơ là 18 (95,1%), tiếp đến là type 16 (48,8%). HPV6 có nguy cơ gây UTCTC thấp cũng là type hay gặp trong loại hình đa nhiễm (82,9%).

Bảng 5. Tỷ lệ các type HPV theo loại hình nhiễm HPV

Loại hình nhiễm HPV	Đơn		Hai		Ba		Bốn		Năm		Tổng cộng	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Nguy cơ thấp	8	13,6	1	1,7	0	-	0	-	0	-	9	15,2
Nguy cơ cao	10	16,9	5	8,5	1	1,7	0	-	0	-	16	27,1
Hỗn hợp	-	-	13	22,0	11	18,6	8	13,5	2	3,4	34	57,7
Tổng cộng	18	30,5	19	32,2	12	20,3	8	13,5	2	3,4	59	100,0



Hình 2. Kết quả reverse DOT BOT: loại hình đồng nhiễm 3 type (a), nhiễm 4 type (b) và nhiễm 5 type (c) HPV tương ứng với vị trí các type HPV tương ứng trên màng lai (d)

Loại hình nhiễm chỉ một type HPV chiếm 30,4% trong số các trường hợp HPV dương tính, trong đó nhiễm type có nguy cơ cao là 16,9%. Đồng nhiễm hai và ba type HPV chiếm tỷ lệ lần lượt là 32,2% và 20,3%, có đến 8 trường hợp (13,5%) đồng nhiễm bốn type và 2 trường hợp (3,4%) đồng nhiễm năm type. Hầu hết các loại hình đồng nhiễm đều có nhiễm các type HPV thuộc nhóm có nguy cơ cao, chỉ 1 trường hợp (1,7%) nhiễm đồng thời 2 type HPV nguy cơ thấp.

4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu chúng tôi có 59 (33,3%) trường hợp dương tính với HPV, trong đó có 9 type HPV được phát hiện gồm 2 type thuộc nhóm có nguy cơ gây UTCTC thấp và 7 type thuộc nhóm có nguy cơ cao. Tỷ lệ nhiễm HPV trong nghiên cứu của Phạm Việt Thanh trên bệnh nhân có kết quả phết tế bào cổ tử cung bất thường là 62,1±0,49, nhiễm HPV16 chiếm tỷ lệ cao nhất 53,1%, HPV18 là 19,8% và HPV6 là 28,7% [6]. Nghiên cứu của Vũ Thị Nhung (2006) trên đối tượng là phụ nữ thành phố Hồ Chí Minh cũng cho kết quả là HPV18 chiếm tỷ lệ cao nhất (52,23%), còn type 16 chiếm 13,34% [3]. Kết quả của Trương Quang Vinh tại Huế ở phụ nữ có thương tổn tiền ung thư và ung thư cổ tử cung cho thấy tỷ lệ nhiễm HPV là 55,4%, trong đó type 16 cao nhất (49,2%), tiếp theo là type 18 (19,0%) [7]. Kết quả của chúng

tôi cho thấy HPV18 hay gặp nhất (74,6%), type 6 là 66,1% và type 16 là 37,3%. Tỷ lệ nhiễm trùng HPV các type nguy cơ cao HPV16/HPV18 chiếm tỷ lệ 60-70% trong tất cả các nhiễm trùng HPV ở cơ quan sinh dục phụ nữ. Các nghiên cứu về HPV ở trong nước gần đây dùng real-time PCR xác định 14 type nguy cơ cao tìm thấy HPV16 chiếm ưu thế, tiếp đến là HPV18, tỷ lệ nhiễm đơn type chiếm trên 80% [5] [8]. Như vậy, chúng ta thấy sự phân bố các type HPV khác nhau phụ thuộc vào từng vùng địa lý, từng khu vực.

Về loại hình nhiễm HPV, nghiên cứu chúng tôi có 30,4% trường hợp đơn nhiễm một type HPV, cao nhất là nhiễm hai 32,2%, nhiễm ba 20,3%, nhiễm bốn 13,5% và nhiễm năm là 3,4%. Trong các trường hợp đa nhiễm HPV, type 18 kết hợp với các kiểu gen khác chiếm tỷ lệ cao nhất (95,1%). Các type nguy cơ thấp HPV6 và HPV11 chỉ được phát hiện ở một số nghiên cứu khi dùng kỹ thuật PCR kết hợp với Dot Blot và tìm thấy với tỷ lệ thấp. Các nghiên cứu trên thế giới với số lượng lớn bệnh nhân có kiểm soát, tỷ lệ đơn nhiễm HPV chiếm >80%, tỷ lệ đa nhiễm chỉ chiếm 8-14% [9] but the risk associated with the various HPV types has not been adequately assessed. METHODS: We pooled data from 11 case-control studies from nine countries involving 1918 women with histologically confirmed squamous-cell cervical cancer and 1928 control women. A common

protocol and questionnaire were used. Information on risk factors was obtained by personal interviews, and cervical cells were collected for detection of HPV DNA and typing in a central laboratory by polymerase-chain-reaction-based assays (with MY09/MY11 and GP5+/6+ primers).

Kết quả nghiên cứu của Trương Quang Vinh cho thấy tỷ lệ nhiễm HPV ở phụ nữ có tổn thương tiền ung thư và ung thư cổ tử cung với loại hình đơn type là 46,7% và đa type là 53,3% [7]. Nhiễm trùng HPV các nhóm có nguy cơ cao dai dẳng hoặc tái phát được xác định là nguyên nhân chính dẫn đến ung thư cổ tử cung [6]. Lee đã chỉ ra mối liên quan giữa nhiễm HPV và ung thư cổ tử cung là: nhiễm HPV một

type duy nhất dẫn đến nguy cơ ung thư cổ tử 19,9 lần và nhiễm nhiều type HPV sẽ làm tăng nguy cơ 31,8 lần [10].

5. KẾT LUẬN

Phối hợp hai kỹ thuật real-time PCR và kỹ thuật reverse DOT BLOT chúng tôi xác định được hai type HPV nguy cơ cao gây UTCTC thường gặp là type 18 (74,6%) và type 16 (37,6%); loại hình đa nhiễm chiếm tỷ lệ cao đến 69,5% trong đó đồng nhiễm 2 và 3 type HPV thường gặp nhất (32,2% và 20,3%), có cả loại hình đồng nhiễm 4 và 5 type nhưng với tỷ lệ thấp. Đa số các trường hợp đồng nhiễm đều có nhiễm type 18 là type HPV nguy cơ cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bolatti E.M., Chouhy D., Casal P.E., et al. (2016). Characterization of novel human papillomavirus types 157, 158 and 205 from healthy skin and recombination analysis in genus γ -Papillomavirus. *Infect Genet Evol*, **42**, 20–29.
2. Ibeanu O. a (2011). Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther*, **11(3)**, 295–306.
3. Nhung V.T. (2006). Khảo sát tình hình nhiễm các týp HPV (Human Papilloma Virus) ở phụ nữ thành phố Hồ Chí Minh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. *Y học TP Hồ Chí Minh*, **10(4)**, 402–407.
4. Nhung V.T. (2007). Liên quan giữa các type và các tổn thương tiền ung thư và ung thư cổ tử cung tại BV Hùng Vương. *Kỷ yếu hội nghị Sản Phụ khoa Việt Pháp Châu Á Thái Bình Dương lần thứ VII*.
5. Lê Quang Vinh, Đàm Thị Quỳnh Liên, Lưu Thị Hồng, Lê Hoài Chương, Lê Hoàng Linh, Nguyễn Thị Hồng Nga, Đào Duy Quân N.V.T. (2017). Tình Trạng Nhiễm HPV Nguy Cơ Cao ở Những Phụ Nữ Có Tổn Thương Tân Sản Nội Biểu Mô Và Ung Thư Cổ Tử Cung. *TC*, **14(2)**.
6. Thanh P.V. (2011). Nghiên cứu tỉ lệ nhiễm Human Papillomavirus ở phụ nữ có phết tế bào cổ tử cung bất thường và các yếu tố liên quan. *Y học TP Hồ Chí Minh*, **15(1)**, 158–165.
7. Vinh T.Q. and Thành C.N. (2010). Nghiên cứu nhiễm Human Papillomavirus ở phụ nữ có các tổn thương tiền ung thư và ung thư cổ tử cung. *Y học thực hành*, **718+719**, 229–240.
8. Yên P.T.T., Vinh L.Q., Dương N.K., et al. (2016). Tỷ Lệ Nhiễm Human Papilloma Virus ở Phụ Nữ Đến Khám Tại Bệnh Viện Phụ Sản Trung Ương. *TC Phụ sản*, **14(1)**.
9. Muñoz N., Bosch F.X., de Sanjosé S., et al. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, **348(6)**, 518–27.
10. Lee S.A., Kang D., Seo S.S., et al. (2003). Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV DNA chip™. *Cancer Lett*, **198(2)**, 187–192.