

# NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG MULTIPLEX PCR PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH TYPE HPV GÂY BỆNH

VŨ XUÂN NGHĨA, HOÀNG ANH TUẤN  
Học viện Quân y

## TÓM TẮT

HPV (Human Papilloma Virus) gây ung thư cổ tử cung, đặc biệt nhóm nguy cơ cao (High-Risk). Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng multiplex-PCR phát hiện và định type HPV. 100 phụ nữ có độ tuổi từ 22-57 (trung bình 34) được lấy dịch cổ tử cung và chạy M-PCR. Kết quả, 28 trong 100 mẫu dương tính với HPV (28%). Trong đó, type 18 chiếm 26%, type 18/16 chiếm 1% và type 6/11 chiếm 1%. Tỷ lệ này cho thấy tỷ lệ nhiễm type 18 chiếm chủ yếu và một phần nhỏ là đồng nhiễm 18/16 và 6/11. Nhưng chúng đều thuộc nhóm HR dễ gây ung thư cổ tử cung ở người.

**Từ khóa:** HPV, M-PCR

## SUMMARY

HPV (Human Papilloma Virus) causes cervical cancer, particularly, in high-risk groups (HR). In this study, multiplex-PCR was applied to detect and type HPV. The M-PCR was performed on 100 cervical preservcyt fluid specimens collected from women with age from 22 to 57 (mean 34). As a result, 28 of the 100 samples tested positive for HPV (28%). Of these, 26% type 18, type 18/16 up 1% and type 6/11 accounted for 1%. This ratio shows that the prevalence of type 18 is dominated in all and a small percentage is co-infected with 18/16 and 6/11. But the types HPV is belonged to the HR group can cause to cervical cancer in humans.

**Keywords:** HPV, M-PCR

## ĐẶT VẤN ĐỀ

HPV có vật chất di truyền là DNA mạch đôi, có nhiều type khác nhau và thuộc họ Papovaridae. Là một tác nhân gây ung thư cho phụ nữ đứng thứ hai trên thế giới. Ngoài ra, HPV thuộc nhóm nguy cơ cao cũng là nguyên nhân gây ung thư âm đạo, ung thư âm hộ, ung thư hậu môn, ung thư dương vật, ung thư đầu và cổ. Có khoảng 100 loại HPV, trong 40 loại gây bệnh ở cơ quan sinh dục con người, có 15 loại được liệt vào hạng "độc" tạo nguy cơ cho sức khỏe. Hai loại thông thường nhất là HPV-16 và HPV-18 có khả năng nhiễm sâu vào cổ tử cung phụ nữ (3-10%), sau đó làm thay đổi mô tử cung và gây bệnh ung thư cổ tử cung. Loại ít độc hơn, HPV-6 và HPV-11, có thể gây 90% chứng mụn cóc (mào gà) của cơ quan sinh dục. Loại nhẹ gây chứng mụn cóc ở tay là (HPV-2) và bàn chân là (HPV-1).

Phát hiện DNA HPV và xác định loại HPV rất quan trọng đối với nghiên cứu lịch sử tự nhiên của HPV, phát triển vắc xin và chăm sóc bệnh nhân. Hơn nữa, xác định kiểu gen của HPV để nghiên cứu các triệu chứng lâm sàng và dịch tễ học của các trường hợp nhiễm HPV, dùng thử vắc xin... Có vài phương pháp để xác định kiểu gen của HPV như dùng probe trực tiếp với Southern blot và lai in-situ, các phương pháp khuếch đại tín hiệu HC2 (hybrid capture II), và phương pháp

PCR. Các phương pháp này có độ đặc hiệu, độ nhạy, độ phức tạp và chi phí khác nhau.

Phương pháp M-PCR là phương pháp thực hiện đơn giản, giá thành hạ và có thể thực hiện tại các trung tâm y tế trang bị không quá hiện đại. Bởi vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi ứng dụng M-PCR với cặp mỗi đặc hiệu phát hiện, định type HPV trên bệnh nhân nghiên cứu.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Mẫu nghiên cứu:** 100 mẫu dịch cổ tử cung được lấy từ phụ nữ đến khám tại Trung tâm nghiên cứu ứng dụng Sinh - Y - Dược - Học viện Quân y từ tháng 1 đến tháng 3 năm 2013.

**Chuẩn bị mẫu:** Mẫu nghiên cứu được tách chiết DNA khi sử dụng kit Dneasy tissue Kit (Qiagen, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

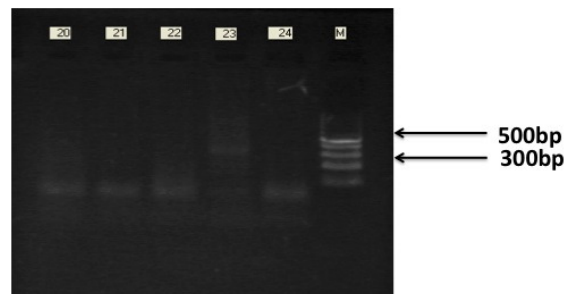
**Cặp môi nghiên cứu:** các cặp môi được thiết kế và sử dụng từ tác giả trước đây, đặc hiệu cho mỗi type HPV (6,11,16,18,26,31).

**Multiplex PCR:** sử dụng mPCR qiagen kit (Qiagen, Germany). Qui trình được thực hiện: giai đoạn ủ xoắn 95° trong 15 phút, 94° trong 30", 65° trong 90", 72° trong 90" chạy 30 vòng và giai đoạn kéo dài ở 72° trong 10'. Sản phẩm PCR phân tích bằng agarose 2% nhuộm với ethidium bromide, kích cỡ được so sánh với DNA chuẩn 100bp (Fermentas International, Canada).

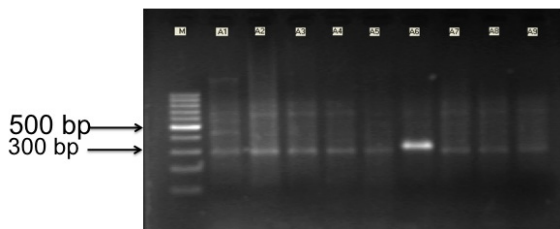
## KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Để ứng dụng M-PCR phát hiện và định type HPV trong mẫu bệnh phẩm, các cặp mỗi đặc hiệu được kết hợp trong phân tích mỗi mẫu được chuẩn hóa trước khi sử dụng.

Trong 100 mẫu dịch cổ tử cung được phân tích bởi M-PCR với những cặp mỗi đặc hiệu. Nhóm nguy cơ cao dương tính được phát hiện khi là nhóm HR hoặc có thể HR type HPV và nhóm không thuộc nhóm nguy cơ cao khi chúng là nhóm nguy cơ thấp hoặc không phát hiện HPV.



Hình 1: Hình ảnh sản phẩm PCR sau khi chạy M-PCR và phân tích trên agarose 2%. Mẫu 20,21,22,24 âm tính; mẫu 23 dương tính (300bp) thuộc type HPV 18



Hình 2: Sản phẩm PCR của M-PCR được phân tích trên agarose 2%. M: DNA chuẩn 100bp; A2,3,4,5,7,8,9: type HPV 18 kích cỡ band 300bp; A1: type HPV 16/18 (467bp; 300bp); A6: type HPV 6/11 (sản phẩm >300 bp)

Kết quả cho thấy, M-PCR với những cặp mồi đặc hiệu có khả năng phát hiện nhiều type HPV đồng nhiễm. Trong 100 mẫu nghiên cứu, M-PCR phát hiện 28 mẫu dương tính với nhiều type HPV khác nhau. Type HPV 18 được phát hiện trong 26 mẫu/100 mẫu (26%), trong khi đó phát hiện 2 mẫu đồng thời nhiễm 2 type HPV, 1 mẫu đồng nhiễm 16/18 và 1 mẫu đồng nhiễm 6/11. Bước đầu nghiên cứu cho thấy, tỉ lệ nhiễm trong cộng đồng đối với HPV là 28%, chủ yếu là nhiễm type HPV 18 (26%). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Florian J. Schweigert khi nghiên cứu trên 100 mẫu dịch cổ tử cung thấy có 21% dương tính với HPV khi thực hiện phương pháp M-PCR. Theo Schiffman M, tỉ lệ nhiễm HPV trong đó type HPV 16, 18 chiếm tỉ lệ 70% gây ung thư cổ tử cung. Trong nhóm nghiên cứu 100 mẫu của chúng tôi, có tới 26% nhiễm type HPV 18, điều này cho thấy số bệnh nhân

nhiễm type HPV 18 có nguy cơ cao ung thư cổ tử cung.

### KẾT LUẬN

Nghiên cứu ứng dụng M-PCR phát hiện và định type HPV trong 100 mẫu nghiên cứu, kết quả cho thấy tỉ lệ nhiễm là 28%, trong đó nhiễm type HPV 26% phần còn lại đồng nhiễm 18/16 và 6/11. Điều này cho thấy, sự nhiễm tiềm ẩn type HPV thuộc nhóm nguy cơ cao gây ung thư cổ tử cung.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Florian J.Schweigert, Jens Railla, 2005. *Validation of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of human papillomavirus and chlamydia trachomatis in cervical preservCyt samples. Clinical Chemistry 51, No.7; 1301-1302.*
2. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*; 370(9590):890-907.
3. Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, et al. 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer*; 111(2):278-285.
4. Watson M, Saraiya M, Ahmed F, et al. 2008. Using population-based cancer registry data to assess the burden of human papillomavirus-associated cancers in the United States: overview of methods. *Cancer*; 113:2841-2854.
5. Jayaprakash V, Reid M, Hatton E, et al. 2010. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis. *Oral Oncology* 2011; 47(11):1048-1054.