ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

VŨ KỲ LIÊN

XÁC ĐỊNH GENOTYPE HPV (*HUMAN PAPILLOMA VIRUS*) Ở MỘT SỐ PHỤ NỮ TỚI KHÁM TẠI KHOA SẢN CỦA BỆNH VIỆN TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y KHOA THÁI NGUYÊNNHIỄM VIRUS BẰNG KỸ THUẬT LAI PHÂN TỬ REVERSE DOT BLOT

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên, 2015

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN http://www.ltc.tnu.edu.vn

MỤC LỤC

MỤC LỤC i
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT iv
DANH MỤC HÌNH ẢNH v
DANH MỤC BẢNG vi
MỞ ĐẦU 1
1. Đặt vấn đề 1
2. Mục tiêu nghiên cứu 2
3. Nội dung nghiên cứu 2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. HPV – Human Papilloma Virus 3
1.1.1. Đặc điểm HPV 3
1.1.2. Bộ gen HPV 4
1.1.3. Phân type HPV 9
1.1.4. Chu kỳ sống 10
1.2. Ung thư cổ tử cung do HPV ở người 13
1.2.1. Các bệnh do HPV 13
1.2.2. Ung thư cổ tử cung 14
1.2.3. Dịch tễ học HPV 18
1.3. Các phương pháp phát hiện HPV 20
1.3.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới 20
1.3.2. Tình hình nghiên cứu trong nước 21
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 24
2.1. Vật liệu nghiên cứu 24
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu 24
2.1.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất 24
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu 25
2.3. Phương pháp nghiên cứu 26
2.3.1. Phương pháp thu nhận và xử lý mẫu bệnh phẩm 26

2.3.2. Phương pháp tách chiết DNA bằng phenol - chloroform.....26
2.3.3. Phương pháp Realtime-PCR phát hiện HPV-DNA 27
2.3.4. Phương pháp lai Reverse Dot Blot (RDB) 28
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....31
3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số và phát hiện HPV-DNA.....31
3.2. Kết quả xác định type (genotype) virus HPV.....34
3.2.1. Kiểu type HPV được phát hiện 36
3.2.2. Sự phân bố của các types HPV được phát hiện 37
3.2.3. Sự đồng nhiễm các type HPV 38
KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ 41
KẾT LUẬN 41
KHUYẾN NGHỊ 41
TÀI LIỆU THAM KHẢO 42

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Nghĩa tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
1	ASCUS	Atypical Squamous cell of Undetermined Significance	Thay đổi tế bào biểu mô gai không điển hình
2	CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia	Tân sinh trong biểu mô cổ tử cung
3	EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	
4	EV	Epidermaldysplasia Vereuciform	Rối loạn mụn cóc da biểu mô
5	HGSIL	High-grade Squamous Intraepithelial Lesion	Tổn thương biểu mô lát mức độ cao
6	IARC	International Agency for Resegrch on Cancer	Tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế
7	kb	Kilo base	
8	kDa	Kilodalton	
9	LCR	Long Control Region	Vùng điều khiển dài
10	LSIL	Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion	Tổn thương biểu mô lát mức thấp
11	ORF	Open reading frame	Khung đọc mở
12	PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
13	RDB	Reverse Dot Blot	Lai phân tử
14	SIL	Squamuos Intraepithelial Lesion	Tổn thương biểu mô vảy
15	URR	Upstream Regulatory Region	Vùng điều hòa thượng nguồn
16	VLPs	Virus like particles	Hạt virus giả

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Sự hình thành capsid của genome HPV 3
Hình 1.2. Hình dạng HPV 4
Hình 1.3. Cấu trúc bộ gene HPV 5
Hình 1.4. Bộ gene HPV dạng mạch thẳng 6
Hình 1.5. Cấu tạo hạt giả virus 6
Hình 1.6. Hình ảnh HPV gây mụn cóc trên da và sùi mào gà miệng 14
Hình 1.7. Sơ đồ tóm tắt cơ chế gây ung thư của HPV 15
Hình 1.8. Hình ảnh ung thư cổ tử cung 17
Hình 1.9. Hình ảnh tế bào biểu mô cổ tử cung bình thường (trái) và tế bào ung thư cổ tử cung (phải) 18
Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt quy trình xác định type HPV trên mẫu bệnh phẩm 26
Hình 3.1. Kết quả phát hiện HPV (HPV-DNA dương tính) 32
bằng kỹ thuật Realtime-PCR. 32
Hình 3.2. Tín hiệu huỳnh quang mầu FAM và mầu JOE của chứng dương. 32
Hình 3.3. Tín hiệu huỳnh quang mầu FAM và mầu JOE 33
của chứng âm. 33
Hình 3.4. Tín hiệu huỳnh quang mầu FAM và mầu JOE 33
của mẫu xét nghiệm 33
Hình 3.5. Sơ đồ vị trí gắn các mẫu dò probes đặc hiệu cho 24 types HPV trên màng lai. 36
Hình 3.6. Biểu đồ phân bố các types HPV 37
Hình 3.7. Tỷ lệ đồng nhiễm các type HPV 39
Hình 3.8. Kết quả màng lai với nhóm HPV nguy cơ thấp (type 6, 11 và 81) 40
Hình 3.9. Kết quả màng lai với nhóm HPV nguy cơ cao (type 16 và 18) 40
Hình 3.10. Kết quả màng lai với kiểu đồng nhiễm HPV nguy cơ thấp-thấp 40
Hình 3.11. Kết quả màng lai với kiểu đồng nhiễm HPV nguy cơ cao-thấp 40

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Các dung dịch và đệm sử dụng trong thí nghiệm 24
Bảng 2.2. Các thiết bị được sử dụng trong thí nghiệm 25
Bảng 3.1. Tỷ lệ nhiễm các type HPV 37
Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm đơn thuần và đồng nhiễm các types HPV 38
Bảng 3.3. Tỷ lệ đồng nhiễm các types HPV 38

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Hiện nay ung thư cổ tử cung là loại ung thư xếp thứ hai trong các bệnh ung thư phổ biến của phụ nữ trên thế giới nhưng lại chiếm vị trí đầu trong các bệnh ung thư của phụ nữ ở các nước đang phát triển. HPV (*Human Papilloma Vius*) đã và đang là mối nguy hiểm đe dọa sức khỏe của những người phụ nữ mắc ung thư cổ tử cung hoặc những phụ nữ mang virus này. HPV được định type (genotype) dựa trên sự khác biệt về trình tự DNA của virus. Đến nay các nhà khoa học đã xác định được trên 100 type HPV khác nhau trong đó hơn 80 type đã được giải trình tự toàn bộ hệ gen và các type còn lại cũng đã được giải mã một phần. Dựa trên khả năng gây ra các tổn thương mô học, đặc biệt là khả năng gây ung thư cổ tử cung, HPV được chia làm hai nhóm: nhóm HPV nguy cơ cao (High-risk HPV) gồm các type HPV16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68 ,70... trong đó HPV16, 18 chiếm tỷ lệ cao nhất. Các type HPV nguy cơ cao là nguyên nhân chính gây ra các tổn thương nghiêm trọng và phát triển thành ung thư cổ tử cung. Nhóm HPV nguy cơ thấp (Low-risk HPV) gồm các type HPV1, 2, 6, 8, 9, 11, 42, 43, 44, 48, 49, 50, 64... phổ biến nhất là HPV6, 11. Các type nguy cơ thấp là tác nhân gây nên đa số các dạng sùi mào gà sinh dục (HPV6, 11), mụn cóc ở chân (HPV1), mụn cơm ở tay (HPV2) và các dạng viêm nhiễm khác.

Mối liên quan giữa nhiễm HPV và ung thư cổ tử cung đã được xác định từ những năm 70 của thể kỷ trước, theo đó HPV gây ra rối loạn sinh sản của tế bào biểu mô cổ tử cung, với diễn tiến tự nhiên từ viêm nhiễm mạn tính, đến dị sản nhẹ, dị sản vừa, dị sản nặng, rồi ung thư cổ tử cung. Tuy hầu hết (khoảng 98%) tình trạng nhiễm HPV sẽ tự khỏi, nhưng các types HPV thuộc nhóm nguy cơ cao có thể làm tổn thương cổ tử cung nặng hơn hoặc thành ung thư, thường sau khoảng 10 năm. Khi đã bị nhiễm và có tổn thương do HPV, không có thuốc điều trị đặc hiệu cho HPV, để tránh nguy cơ tổn thương diễn tiến nặng hơn, chỉ có một cách điều trị là lấy đi tổn thương này.

Hạn chế quan hệ tình dục sớm, không quan hệ tình dục với nhiều người và tình dục an toàn là những cách có thể giúp giảm nguy cơ nhiễm HPV. Tuy nhiên, cách phòng ngừa nhiễm HPV hiệu quả nhất là tiêm ngừa vacxin, hiện nay ở Việt Nam đang lưu hành 3 loại vacxin phòng 4 types HPV phổ biến (type 6, 11, 16 và 18) đó là vacxin Vacxin Gardasil (MERCK &CO., Inc.,) và vacxin Cervarix (GlaxoSmithKline). Với những tiến bộ của y khoa hiện đại, ung thư cổ tử cung có thể được chữa khỏi nếu bệnh được phát hiện sớm. Do đó bên cạnh việc tầm soát ung thư cổ tử cung bằng xét nghiệm tế bào học cổ tử cung (xét nghiệm PAP) thì việc phát hiện tình trạng nhiễm HPV và định type virus này cũng có vai trò rất quan trọng.

Trên cơ sở các kết quả thu được từ những đề tài nghiên cứu về HPV trước đây, chúng tôi thực hiện đề tài "Xác định genotype HPV (*Human Papilloma Virus)* ở một số phụ nữ tới khám tại khoa sản của Bệnh viện Trường Đại học Y khoa Thái Nguyên nhiễm virus bằng kỹ thuật lai phân tử Reverse Dot Blot".

2. Mục tiêu nghiên cứu

1. Phát hiện được HPV ở phụ nữ bằng kỹ thuật Realtime-PCR.
2. Xác định được genotype HPV bằng kỹ thuật lai phân tử Reverse Dot Blot.

3. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu và phát hiện tình trạng nhiễm HPV ở nhóm phụ nữ được lựa chọn bằng kỹ thuật Realtime-PCR.

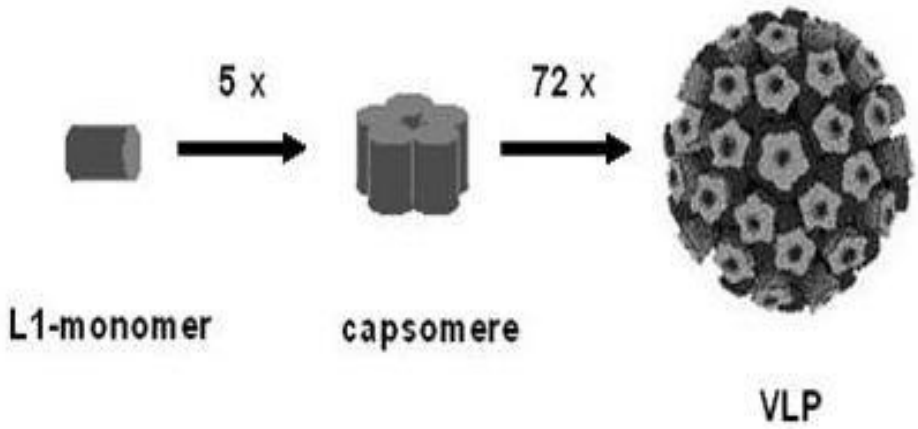
- Xác định các genotype HPV ở những trường hợp nhiễm virus này bằng kỹ thuật lai phân tử Reverse Dot Blot.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

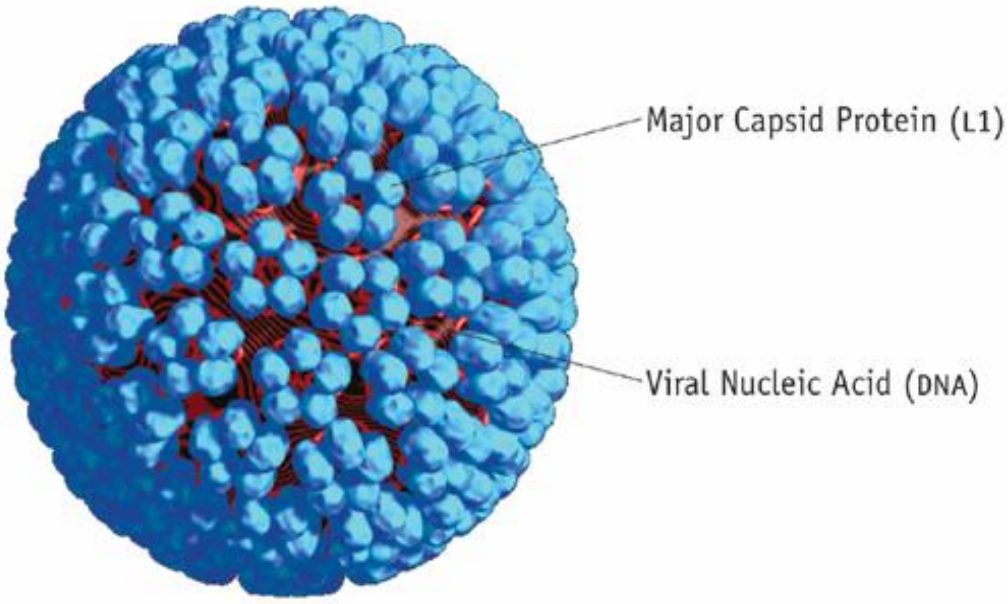
1.1. HPV – Human Papilloma Virus

1.1.1. Đặc điểm HPV

Human Papilloma Virus (HPV) là nhóm virus có kích thước nhỏ, mang vật liệu di truyền là DNA, gây bệnh ở người thuộc họ Papovaviridae. HPV có cấu trúc capsid không vỏ và đối xứng xoắn ốc, đường kính hạt virus khoảng 52- 55nm chứa DNA dạng vòng, mạch đôi, liên kết với protein giống histone. Vỏ capsid được tạo thành từ 72 đơn vị capsomere, mỗi đơn vị là một pentamer của protein cấu trúc L1 và một protein cấu trúc L2 (protein này là thành phần kháng nguyên được sử dụng trong miễn dịch đặc hiệu). Cả hai protein cấu trúc đều do virus tự mã hóa: Protein capsid chính (L1) chiếm khoảng 80% tổng số protein của virus. Protein capsid phụ (L2) chiếm khoảng 20%. Riboxom có hệ số lắng là 21S. Tiểu phần lớn có một vòng xoắn cuộn có thể chuyển đổi thành tiểu phần nhỏ trong quá trình sao chép. Ngoài ra, một tiểu phần thứ 3 có hệ số lắng là 14S sẽ xuất hiện chịu trách nhiệm sao chép lại DNA tế bào chủ khi bao trong Virion. Khi đó, capsid chứa DNA tế bào chủ được gọi là Virion giả hay Pseudovirion.



Hình 1.1. Sự hình thành capsid của genome HPV



Hình 1.2. Hình dạng HPV

HPV không phát triển trong điều kiện nuôi cấy trong phòng thí nghiệm, do đó muốn thực hiện đề tài này chỉ có thể dựa trên nghiên cứu invivo trên người bị nhiễm và những mẫu bị nhiễm sẽ được lưu giữ ở nhiệt độ -70^{0}C trong một thời gian dài mà không làm ảnh hưởng tới khả năng hoạt động của virus [22].

1.1.2. Bộ gen HPV

Genome của HPV là một phân tử ADN kép không hoàn chỉnh, siêu xoắn vòng tức là capsome sắp xếp xung quanh theo chiều xoắn của acid nucleic (ở đây là DNA) tạo thành ống giống như cầu thang xoắn, chiều dài của capsid phụ thuộc chiều dài sợi acid nucleic, bộ gen virus chiếm 12% trọng lượng hạt virus, có kích thước nằm trong khoảng 7,2 kb đến 8,1 kb (trong đó các base Guanine và Cytosine chiếm 42%), 10 khung đọc mở ORF. Khung đọc mở mã hoá cho toàn bộ protein của HPV nằm trên một mạch của phân tử ADN kép, tức là sự sao chép, phiên mã xảy ra trên một mạch và chỉ theo một chiều duy nhất [22].