

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

LƯU THỊ DUNG

**ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ VÙNG GEN L1, E6 VÀ E7
CỦA HUMAN PAPILLOMAVIRUS TRÊN MỘT SỐ
NHÓM ĐỐI TƯỢNG VÀ PHÁT TRIỂN BỘ MẪU
CHUẨN CHO 14 TÝP NGUY CƠ CAO Ở VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

LƯU THỊ DUNG

**ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ VÙNG GEN L1, E6 VÀ E7
CỦA HUMAN PAPILLOMAVIRUS TRÊN MỘT SỐ
NHÓM ĐỐI TƯỢNG VÀ PHÁT TRIỂN BỘ MẪU
CHUẨN CHO 14 TÝP NGUY CƠ CAO Ở VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9 42 01 07

LUẬN ÁN TIẾN SỸ SINH HỌC

Cán bộ hướng dẫn:

1. PGS.TS. Nguyễn Văn Trang
2. GS.TS. Phan Thị Ngà

HÀ NỘI - 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Lưu Thị Dung, nghiên cứu sinh khoá 38 thuộc Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, chuyên ngành Vi sinh vật học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS. TS Phan Thị Ngà và PGS.TS. Nguyễn Văn Trang.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Tác giả luận án

Lưu Thị Dung

Lời cảm ơn

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Ban giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau đại học viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành Luận án này.

Tôi xin cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ, Quỹ Newton – Vương Quốc Anh đã tài trợ cho nghiên cứu trong khuôn khổ hợp tác nghiên cứu song phương đa phương giữa Vương Quốc Anh – Việt Nam, mã số đề tài HNQT/SPDP/03.16.

Tôi xin trân trọng cảm ơn GS.TS. Đặng Đức Anh chủ nhiệm đề tài “Đặc điểm dịch tễ học, gánh nặng bệnh tật liên quan đến nhiễm HPV ở Việt Nam” – Viện Trưởng Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã cho phép tôi tham gia và sử dụng kết quả của đề tài được trình bày trong Luận án.

Để hoàn thành luận án này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS.TS. Phan Thị Ngà và PGS.TS. Nguyễn Văn Trang những người thầy đã trực tiếp hướng dẫn, tạo mọi điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu, học tập và rèn luyện các kỹ năng để hoàn thành Luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đặc biệt tới Ban Lãnh đạo Viện Kiểm Định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến TS. Đoàn Hữu Thiển, người có ảnh hưởng lớn đối với tôi trong định hướng học tập, nghiên cứu về sự cẩn thận, ý thức trách nhiệm trong công việc.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô, cán bộ tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin chân thành cảm ơn các cán bộ Phòng nghiên cứu phát triển vắc xin và sinh phẩm, Trung tâm nghiên cứu y sinh học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã luôn tận tình giúp đỡ, tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn các cán bộ Khoa Kiểm định vắc xin vi rút, Viện Kiểm Định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã tạo điều kiện giúp đỡ cho tôi học tập và trao dồi những kinh nghiệm trong nghiên cứu khoa học về vi rút học và vắc xin vi rút.

Tôi xin chân thành cảm ơn các cán bộ Khoa Sinh phẩm y tế, Viện Kiểm Định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã tạo điều kiện giúp đỡ cho tôi trong quá trình nghiên cứu khoa học về xây dựng vắc xin mẫu chuẩn, sinh phẩm chuẩn và đánh giá chất lượng sinh phẩm y tế.

Tôi xin cảm ơn các cán bộ Phòng Khoa học đào tạo - Hợp tác quốc tế đã cho tôi tham khảo các tài liệu khoa học liên quan đến lĩnh vực nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn các cán bộ Khoa Xuất xưởng – Giám sát hậu kiểm, Viện Kiểm Định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế nơi tôi đang công tác đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong công việc và học tập.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ tình cảm thân thương và lòng biết ơn đặc biệt đối với gia đình và người thân, bạn bè, đồng nghiệp vẫn luôn ở bên cạnh tôi, nâng đỡ tôi, chia sẻ, động viên, tạo điều kiện cho tôi học tập, nghiên cứu.

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Lưu Thị Dung

MỤC LỤC

DANH MỤC BẢNG.....	x
DANH MỤC HÌNH	xii
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU.....	3
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	4
1.1 Tổng quan về HPV.....	4
1.1.1 Hình thái và cấu trúc phân tử HPV.....	4
1.1.2 Hệ thống phân loại HPV.....	6
1.1.3 Chức năng các gen E6, E7 và L1.....	9
1.1.4 Đặc điểm phân tử lây nhiễm HPV.....	11
1.1.5 Đặc điểm nhân khẩu học liên quan đến lây nhiễm HPV.....	13
1.2 Các phương pháp sinh học phân tử chẩn đoán và phân loại HPV.....	14
1.2.1 Phương pháp lai phân tử.....	14
1.2.2 Phương pháp PCR khuếch đại mục tiêu.....	15
1.2.3 Phương pháp Realtime-PCR.....	16
1.2.4 Phương pháp giải trình tự và dựng cây phát sinh chủng loại.....	16
1.3 Dịch tễ học của HPV trên thế giới và Việt Nam.....	17
1.3.1 Dịch tễ học của HPV đối với MSM trên thế giới và Việt Nam.....	17
1.3.2 Dịch tễ học của HPV đối với PNBĐ trên thế giới và Việt Nam.....	19
1.3.3 Dịch tễ học của HPV đối với sinh viên trên thế giới và Việt Nam.....	20
1.3.4 Dịch tễ học phân tử HPV trên thế giới và Việt Nam.....	20
1.4 Mẫu chuẩn.....	23
1.4.1 Khái niệm và thuật ngữ.....	23
1.4.2 Phân loại bộ mẫu chuẩn HPV.....	23
1.4.3 Đặc tính và thành phần các bộ mẫu chuẩn HPV.....	26
1.4.4 Thiết lập các bộ mẫu chuẩn HPV trong sinh học phân tử.....	30

1.4.5 Bộ Panel mẫu chuẩn HPV sử dụng trong sinh học phân tử trên thể giới và Việt Nam	32
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	34
2.1 Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu	34
2.1.1 Đối tượng nghiên cứu	34
2.1.2 Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng:.....	34
2.1.3 Tiêu chuẩn loại trừ.....	35
2.1.4 Thời gian, địa điểm nghiên cứu.....	36
2.2 Phương pháp nghiên cứu	36
2.2.1 Thiết kế nghiên cứu:	36
2.2.2 Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu	36
2.2.3 Biến số và chỉ số nghiên cứu	37
2.2.4 Kỹ thuật thu thập thông tin.....	38
2.2.5 Nội dung nghiên cứu	39
2.2.6 Quy trình kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu	45
2.3 Sai số và cách khống chế sai số	58
2.4 Phương pháp xử lý số liệu	58
2.5 Đạo đức trong nghiên cứu.....	59
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	60
3.1 Đặc điểm lưu hành và phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018	60
3.1.1 Đặc điểm nhân khẩu học của một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018	60
3.1.2 Tỷ lệ nhiễm HPV ở một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018.....	63
3.1.3 Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018.....	66
3.1.3.1 Số lượng mẫu HPV phân tích đặc điểm di truyền.....	66

3.1.3.2	Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018.....	67
3.2	Phát triển bộ mẫu chuẩn nhằm đánh giá sinh phẩm chẩn đoán Realtime-PCR cho 14 týp HPV nguy cơ cao	102
3.2.1	Panel mẫu chuẩn xác định độ nhạy phân tích.....	103
3.2.2	Panel mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu phân tích.....	106
3.2.3	Panel mẫu chuẩn xác định độ nhạy lâm sàng	108
3.2.4	Panel mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu lâm sàng	112
3.2.5	Panel mẫu chuẩn xác định độ chính xác.....	114
	CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	117
4.1	Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018	117
4.1.1	Đặc điểm nhân khẩu học và nhiễm HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018	117
4.1.2	Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018.....	128
4.2	Phát triển bộ mẫu chuẩn nhằm đánh giá sinh phẩm chẩn đoán Realtime-PCR cho 14 týp HPV nguy cơ cao	138
4.3	Bàn luận những ưu điểm của đề tài.....	143
4.3.1	Chất lượng của nguyên vật liệu, hóa chất và sinh phẩm	143
4.3.2	Cơ sở hạ tầng, trang thiết bị, máy móc.....	143
4.3.3	Quy trình thực hiện.....	144
4.3.4	Phân tích kết quả và sự phù hợp với mục tiêu nghiên cứu	144
4.3.5	Các mẫu đối chứng có sử dụng của phòng thí nghiệm và mẫu chuẩn Quốc tế	146
4.4	Bàn luận những hạn chế của đề tài	146
4.4.1	Hạn chế trong phân tích đặc điểm các yếu tố liên quan đến nhiễm HPV .	146
4.4.2	Hạn chế trong xác định tỷ lệ nhiễm HPV và giải trình tự gen	146
4.4.3	Hạn chế trong quá trình tạo mẫu chuẩn plasmid	147

4.4.4	Hạn chế trong quá trình tạo mẫu chuẩn từ mẫu lâm sàng	147
KẾT LUẬN		148
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN		149
KHUYẾN NGHỊ		150
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ		151
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN		151
TÀI LIỆU THAM KHẢO		152
PHỤ LỤC 1		173
PHỤ LỤC 2		198

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

AA	Axit amin (Amino acid)
ADN	Axit deoxiribonucleotit (Acid deoxyribonucleic)
ARN	Axit ribonucleotit (Acid ribonucleic)
BP	Cặp bazơ (Base pair)
BMC	Bộ mẫu chuẩn
CIN	Tân sinh nội biểu mô cổ tử cung (cervical intraepithelial neoplasia)
CD	Cao đẳng
CV	Hệ số biến thiên (Coefficient of variation)
EMBL	Phòng thí nghiệm sinh học phân tử của Châu Âu (European Molecular Biology Laboratory)
FDA	Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (Food and Drug Administration)
HPV	Vi rút gây u nhú ở người (Human Papillomavirus)
HR-HPV	Vi rút HPV nguy cơ cao (High Risk Human Papillomavirus)
HSIL	Tổn thương tế bào biểu mô vảy mức độ cao (high grade squamous intraepithelial lesion)
IS	Mẫu chuẩn Quốc tế (International Standard)
IC	Chứng nội kiểm (Internal Control)
IU	Đơn vị Quốc tế (International Unit)
LCR	Vùng điều hòa dài (Long Control Region)
LOD	Giới hạn phát hiện (Limit of detection)
LR-HPV	Vi rút HPV nguy cơ thấp (Low Risk Human Pappillomavirus)
LSIL	Tổn thương tế bào biểu mô vảy mức độ thấp (low grade squamous intraepithelial lesion)
MSM	Nam có quan hệ tình dục đồng giới (Men sex men)
NAT	Thử nghiệm axit nucleic (Nucleic Acid Test)
nFSW	Phụ nữ không bán dâm (n-Female sex worker)
NCBI	Ngân hàng gen (National Center for Biotechnology Information)
NIBSC	Viện quốc gia các sinh phẩm chuẩn (National Institute for Biological Standards and Control)

NIHE	Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (National Institute of Hygiene and Epidemiology)
ORF	Khung đọc mở (Open Reading Frame)
PCR	Phản ứng khuếch đại (Polymerase Chain Reaction)
PNBD	Phụ nữ bán dâm
QC	Kiểm soát chất lượng (Quality control)
QHTD	Quan hệ tình dục
RFLP	Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn (Restriction fragment length polymorphism)
RT-PCR	Phản ứng khuếch đại và sao chép ngược (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction)
Realtime-PCR	Phản ứng khuếch đại theo thời gian thực
THPT	Trung học phổ thông
THCS	Trung học cơ sở
TP	Thành phố
TB	Trung bình
TP. HCM	Thành phố Hồ Chí Minh
SĐH	Sau đại học
EUP	Dược điển châu Âu (Europe Pharmacopoeia)
USP	Dược điển Hoa Kỳ (United States Pharmacopoeia)
SOP	Quy trình thực hành chuẩn (Standard Operating Procedure)
UTCTC	Ung thư cổ tử cung
UTHM	Ung thư hậu môn
URR	Vùng điều hòa thượng nguồn (Upstream Regulatory Region)
VLP	Hạt giả vi rút (Virus-like particle)
WHO	Tổ chức y tế thế giới (World Health Organization)
NCL	Phòng thí nghiệm kiểm định Quốc gia (National Control Laboratory)

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. 1 Hệ thống phân loại dòng và dưới dòng của 14 týp HPV [26]	8
 Bảng 2. 1 Biên số và chỉ số nghiên cứu	38
Bảng 2. 2 Danh mục các bộ mẫu chuẩn được phát triển trong nghiên cứu	41
Bảng 2. 3 Các trình tự gốc của 14 týp HPV nguy cơ cao	49
Bảng 2. 4 Thông tin mẫu lâm sàng sử dụng trong nhân dòng và trình tự mỗi đặc hiệu	51
Bảng 2. 5 Thông tin kích thước đoạn gen chèn và vector tái tổ hợp.....	53
 Bảng 3. 1 Đặc điểm nhân khẩu học của MSM tại Việt Nam.....	61
Bảng 3. 2 Đặc điểm nhân khẩu học của PNBD tại Việt Nam	62
Bảng 3. 3 Đặc điểm nhân khẩu học của nữ sinh viên tại Việt Nam	63
Bảng 3. 4 Tỷ lệ nhiễm HPV ở các nhóm đối tượng.....	64
Bảng 3. 5 Phân bố týp HPV ở các nhóm đối tượng.....	65
Bảng 3. 6 Số lượng các trình tự L1, E6-E7 tiến hành phân tích	66
Bảng 3. 7 Đa dạng di truyền vùng gen L1, E6-E7 của các chủng HPV	100
Bảng 3. 8 Đặc tính bộ mẫu chuẩn được phát triển nhằm đánh giá sinh phẩm chẩn đoán Realtime-PCR cho 14 týp HPV nguy cơ cao	103
Bảng 3. 9 Tiêu chí kỹ thuật Panel độ nhạy phân tích.....	104
Bảng 3. 10 Danh mục Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ nhạy phân tích.....	105
Bảng 3. 11 Tiêu chí kỹ thuật Panel độ đặc hiệu phân tích.....	106
Bảng 3. 12 Danh mục Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ đặc hiệu phân tích	107
Bảng 3. 13 Tiêu chuẩn cơ sở Panel độ nhạy lâm sàng.....	108

Bảng 3. 14 Danh mục Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ nhạy lâm sàng	109
Bảng 3. 15 Tiêu chí kỹ thuật Panel xác định độ đặc hiệu lâm sàng.....	112
Bảng 3. 16 Danh mục Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ đặc hiệu lâm sàng.....	113
Bảng 3. 17 Tiêu chí kỹ thuật Panel xác định độ chính xác	114
Bảng 3. 18 Danh mục bộ mẫu chuẩn HPV xác định độ chính xác	116

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1 Cấu trúc phân tử HPV và protein L1	4
Hình 1. 2 Cây phát sinh chủng loại của HPV dựa trên 200 trình tự L1.....	7
Hình 1. 3 Chu trình lây nhiễm HPV ở mức độ phân tử và quá trình phát triển ung thư xâm lấn.....	11
Hình 2. 1 Sơ đồ thiết kế thực hiện nghiên cứu.....	39
Hình 3. 1 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV18.....	68
Hình 3. 2 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV18	69
Hình 3. 3 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV39	71
Hình 3. 4 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV39	72
Hình 3. 5 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV45	73
Hình 3. 6 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV59	74
Hình 3. 7 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV59.	75
Hình 3. 8 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV68.....	77
Hình 3. 9 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV68	78
Hình 3. 10 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV16.....	80
Hình 3. 11 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV16. ...	81
Hình 3. 12 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV31	82
Hình 3. 13 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV31	83
Hình 3. 14 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV33	84
Hình 3. 15 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV33	85
Hình 3. 16 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV35	86
Hình 3. 17 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV35. ...	87

Hình 3. 18 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV52	88
Hình 3. 19 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV52	89
Hình 3. 20 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV58	91
Hình 3. 21 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV58	92
Hình 3. 22 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV51	94
Hình 3. 23 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV51	95
Hình 3. 24 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV56	96
Hình 3. 25 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV56	97
Hình 3. 26 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV66	98
Hình 3. 27 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV66	99

ĐẶT VẤN ĐỀ

Human papillomavirus (HPV) là vi rút gây ra hơn 95% bệnh u nhú ở người [170]. Trong đó, ung thư cổ tử cung (UTCTC) là bệnh ung thư phổ biến thứ tư ở phụ nữ trên toàn cầu, ước tính có khoảng 604.000 ca mắc mới và 342.000 ca tử vong vào năm 2020. Hiện tại có hơn 200 týp HPV đã được xác định, trong đó hơn 40 týp HPV lây lan trực tiếp qua đường tình dục chia thành 2 nhóm, nhóm 14 týp HPV nguy cơ cao bao gồm HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 và 68 và nhóm HPV nguy cơ thấp. Trong số này, HPV16 và HPV18 là nguyên nhân gây ra khoảng 70% UTCTC, các týp HPV còn lại có thể gây ra một số loại ung thư hậu môn (UTHM), hầu họng, dương vật, âm hộ và âm đạo và mụn cóc sinh dục ở cả nam và nữ [111, 112]. Sau khi nhiễm HPV từ 15 đến 20 năm, UTCTC mới phát triển ở những phụ nữ có hệ miễn dịch bình thường nên việc xét nghiệm để phát hiện sớm nhiễm HPV rất có ý nghĩa trong sàng lọc và điều trị [170].

HPV có vật liệu di truyền là ADN mạch vòng kép, dài khoảng 7900 cặp bazơ, phân thành vùng mã hóa và vùng không mã hóa. Vùng mã hóa có khoảng 7 đến 9 khung đọc mở, mã hóa cho các protein sớm (E) gồm các gen E1, E2, E4-E7 và protein muộn (L) gồm L1 và L2 [171]. Các protein E6 và E7 tác động đến chu kỳ tế bào và cơ chế chết theo chương trình, kết quả là sự tăng sinh và biến đổi gây ung thư [106]. Do vậy E6 và E7 là đích cho thiết kế liệu pháp gen trong điều trị. Trong khi đó, khung đọc mở L1 mã hóa các protein capsid chính (55 kDa) tạo nên phần lớn vỏ capsid của vi rút và bề mặt tiếp xúc của nó [164]. Vì vậy, phân tích đặc điểm đa hình của vùng gen E6 và E7 có ý nghĩa trong nghiên cứu cơ chế bệnh học phân tử liên quan đến ung thư, đồng thời phân tích đa hình vùng gen L1 đặc biệt quan trọng trong phân loại và phát triển vắc xin.

Tại Việt Nam đã có một vài nghiên cứu dịch tễ học phân tử trên nhóm đối tượng phụ nữ nhưng chưa có nghiên cứu nào được thực hiện trên nhóm đối tượng nữ sinh viên, phụ nữ bán dâm (PNBD) và nam giới có quan hệ tình dục đồng giới (MSM). Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành định týp HPV và giải trình tự gen E6, E7 và L1 của 14

týp HPV nguy cơ cao được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm của nữ sinh viên, PNBD và MSM và một số mẫu HPV lưu ở Việt Nam. Từ đó, chúng tôi xác định tỷ lệ nhiễm liên quan đến một số đặc điểm nhân khẩu học, phân tích đặc điểm đa hình nucleotit của gen L1, E6 và E7 để phân loại các chủng HPV lưu hành ở Việt Nam.

Trong khi độ đặc hiệu của phương pháp xét nghiệm HPV ADN và xét nghiệm tế bào học (Pap smear) lần lượt là 94,1% và 96,8%, độ nhạy của các phương pháp xét nghiệm HPV ADN là 94,6% cao hơn nhiều so với phương pháp tế bào học (55,4%) [147]. Chính vì vậy, phương pháp phát hiện và định týp ADN của HPV trong các mẫu bệnh phẩm là phương pháp chính được sử dụng trong các nghiên cứu để đo lường gánh nặng của bệnh do HPV gây ra và đánh giá tác động của các chương trình tiêm chủng. Để có được các kết quả thống nhất, có ý nghĩa và có thể so sánh được thì tất cả các phòng thí nghiệm HPV phải sử dụng các xét nghiệm cũng như các sinh phẩm có chính xác, độ nhạy và đặc hiệu phù hợp. Do vậy, việc phát triển và xây dựng các bộ mẫu chuẩn cho HPV tương ứng để đánh giá các chỉ số kỹ thuật cho các phương pháp xét nghiệm hoặc sinh phẩm chẩn đoán HPV là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu thu thập các mẫu lâm sàng, xác định đặc tính mẫu để xây dựng các mẫu chuẩn plasmid tái tổ hợp có chứa một phần trình tự của HPV ADN hoặc sử dụng chính các mẫu bệnh phẩm lâm sàng này để thiết lập bộ mẫu chuẩn đánh giá sinh phẩm chẩn đoán HPV nguy cơ cao bằng Realtime-PCR. Với những mục tiêu đó, chúng tôi đã tiến hành đề tài nghiên cứu: ***“Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của Human Papillomavirus trên một số nhóm đối tượng và phát triển bộ mẫu chuẩn cho 14 týp nguy cơ cao ở Việt Nam”***.

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của Human Papillomavirus trên một số nhóm đối tượng nam giới có quan hệ tình dục đồng giới, phụ nữ bán dân và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018.
2. Phát triển bộ mẫu chuẩn nhằm đánh giá sinh phẩm chẩn đoán Realtime-PCR cho 14 týp Human Papillomavirus nguy cơ cao.

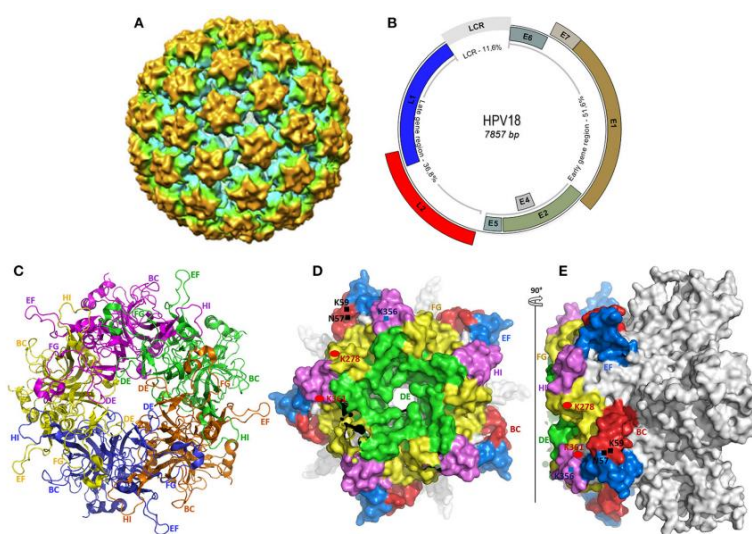
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1 Tổng quan về HPV

1.1.1 Hình thái và cấu trúc phân tử HPV

HPV (Human papillomavirus) có kích thước khoảng 52-55 nm, không có màng ngoài, cấu trúc đối xứng đa diện (icosahedrol). Vỏ capsid bao quanh lõi axit nucleic được cấu tạo từ 72 phân tử protein cấu trúc gọi là các capsome. Mỗi đơn vị capsome là một pentamer gồm 5 đơn vị monomer của protein cấu trúc L1 và L2. Protein chủ yếu của lớp capsid là pentamer cấu trúc của L1, có cấu trúc khối từ các đơn vị 5 góc cạnh (Hình 1.1A) [44].

Hệ gen của HPV là một phân tử ADN kép, mạch vòng, siêu xoắn dài khoảng 7200 - 8000 cặp nucleotit (bp), có khoảng 7 đến 9 khung đọc mở (ORF-Open Reading Frame) liên kết với nhiều phân tử protein kiềm histon. Các khung đọc mở này mã hóa toàn bộ protein của HPV. Hệ gen của HPV mã hóa cho 8-10 protein (Hình 1.1B) [44].



Hình 1. 1 Cấu trúc phân tử HPV và protein L1 [89]

(A) Hạt vi rút HPV dưới kính hiển vi điện tử, (B) Hệ gen của HPV18, (C-E) Cấu trúc pentamer L1 của HPV18

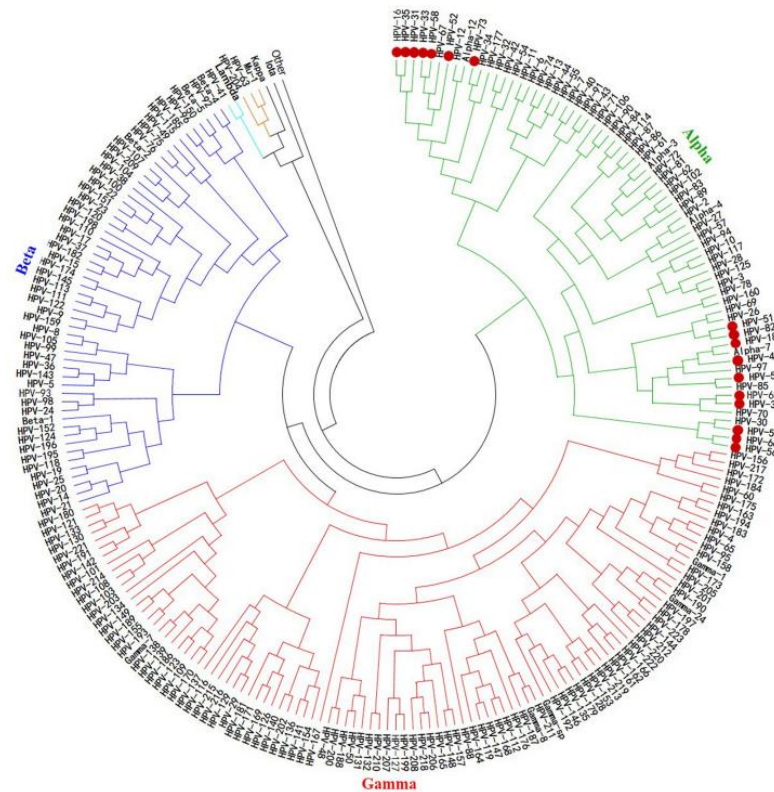
Hệ gen của HPV được phân thành 2 vùng bao gồm vùng mã hóa và vùng không mã hóa, còn được gọi là vùng kiểm soát dài (LCR) hoặc vùng điều hòa thượng nguồn (URR) [86, 91]. Vùng mã hóa protein sớm (early – E) bao gồm các gen từ E1, E2, E4, E5, E6 và E7 và protein muộn (late – L) gồm L1 và L2. Các vùng LCR/URR rất quan trọng trong việc điều hòa sự biểu hiện hệ gen của HPV vì chứa các chất hoạt hóa cũng như các chuỗi gen hỗ trợ quá trình sao mã. Các protein sớm E1 và E2 thực hiện việc phiên mã và nhân lên của vi rút. Một số dạng của protein E4 can thiệp trực tiếp vào cấu trúc và chức năng của tế bào sừng, chúng phá vỡ mạng lưới keratin của tế bào dẫn đến hiện tượng koilocytosis (các tế bào sừng có không bào ở quanh nhân). Protein E1, E2, E4 có vai trò trong việc giải phóng những vi rút mới được hình thành từ các tế bào biểu mô bị tách ra [14, 110]. Các protein E6 và E7 tác động đến chu kỳ tế bào và cơ chế chết theo chương trình, kết quả là sự tăng sinh và biến đổi (gây ung thư). Sự gắn kết protein gây ung thư E6 của HPV nguy cơ cao với protein p53 (hoặc E7 với protein nguyên bào vồng mạc) tạo ra tác nhân bất hoạt protein ức chế khối u tương ứng [173].

Protein capsid chính L1, kích thước khoảng 55 kDa, được mã hóa bởi khung đọc mở dài khoảng 1,7kb (vị trí nucleotit 5430–7136 theo bộ gen HPV18, Hình 1.1B). Cấu trúc protein L1 bao gồm các vùng biến đổi và vùng không đổi. Vùng biến đổi trên protein L1 đặc hiệu cho các týp HPV khác nhau, cấu tạo nên các cấu trúc xoắn vòng BC, DE, EF, FG và HI (Hình 1C – E). Các cấu trúc này mang các vị trí kháng nguyên đặc hiệu tương tác với các thụ thể trên màng tế bào vật chủ trong quá trình xâm nhập tế bào và đóng vai trò trong sản xuất kháng thể trung hòa [52]. Mặc dù có những biến đổi trên trình tự axit amin trên các týp HPV khác nhau, nhưng cấu trúc ba chiều với các vùng cấu trúc xoắn vòng được bảo tồn. Bên cạnh đó, vùng bảo tồn trên protein L1 có vai trò giống nhau, bao gồm liên kết thụ thể màng, tương tác L1 – L1 và L1 – L2 [20, 36].

1.1.2 Hệ thống phân loại HPV

HPV thuộc họ *Papillomaviridae*, là nhóm vi rút có ADN đặc hiệu loài gây nhiễm chọn lọc ở tế bào biểu mô da và niêm mạc ở người và động vật.

Danh pháp Papillomavirus ở cấp loài và trên loài được xác định bởi nhóm nghiên cứu Papillomavirus của Ủy ban quốc tế về phân loại vi rút (ICTV) [55]. Bên dưới cấp độ loài, các loại HPV mới được cung cấp một số duy nhất sau khi toàn bộ hệ gen đã được nhân bản và khai báo với Trung tâm tham chiếu HPV Quốc tế [60]. Trong các nghiên cứu trước đây, hệ thống phân loại HPV chỉ dựa trên trình tự khung đọc mở của gen L1, điều này đã được đồng ý năm 1995 tại Hội thảo Papillomavirus tổ chức ở Quebec [18]. Mặc dù tỷ lệ đột biến gây đa dạng ở Papillomavirus thấp và bị chậm lại bởi hoạt động tự sửa chữa của các enzyme ADN polymerase của tế bào trong quá trình sao chép của vi rút [141, 158], Tuy nhiên, có sự biến đổi gen đáng kể trong Papillomavirus, đặc biệt là ở HPV. Cho đến gần đây, hơn 200 kiểu gen HPV khác nhau đã được mô tả và xác định, khoảng 75% trong số đó đã hoàn thành trình tự và cập nhật trong cơ sở dữ liệu GenBank và EMBL. Hơn 200 tít HPV này đã được xác định và phân tít thành 5 chi: *α-papillomavirus*, *β-papillomavirus*, *γ-papillomavirus*, *μ-papillomavirus* và *ν-papillomavirus* [29], trong đó có 70 tít gây bệnh trên người và động vật (Hình 1.2). Những tít HPV đóng vai trò quan trọng nhất với y học là các tít có nguy cơ gây ung thư sinh dục hoặc ung thư biểu mô niêm mạc, chủ yếu thuộc chi alpha [46]. Các loại HPV gây ung thư niêm mạc trong chi alpha cũng là một nguyên nhân chính gây ra UTCTC [21], UTHM, ung thư âm hộ, dương vật, âm đạo và miệng [23, 24, 173]. Cũng có những loại HPV niêm mạc lành tính trong chi alpha chỉ gây ra u lành tính ở bộ phận sinh dục [25]. Trong số 65 tít HPV thuộc chi alpha, có 14 tít thuộc nhóm nguy cơ cao gây ung thư ở người đã được báo cáo bao gồm HPV16, 31, 33, 35, 52, 58 (dưới chi alpha 9, HPV18, 39, 45, 59, 68 (dưới chi alpha 7), HPV51(dưới chi alpha 5) và HPV56, 66 (dưới chi alpha 6). Ngoài ra còn 2 tít thuộc nhóm nguy cơ thấp gây ra mụn cóc sinh dục phổ biến nhất là HPV6 và 11 (dưới chi alpha 10) [25].



Hình 1. 2 Cây phát sinh chủng loại của HPV dựa trên 200 trình tự L1 [89]

Các chủng HPV thuộc các chi khác nhau có trình tự L1 giống nhau không quá 60%. Các chủng HPV khác nhau trong một chi có trình tự L1 giống nhau từ 60-70%. Một chủng HPV được xác định thuộc tít mới cần có sự khác biệt ít nhất 10% so với bất kỳ loại HPV nào khác trước đó [55]. Gần đây, các nhà khoa học đang có những đề xuất mới lựa chọn những vùng gen khác, thậm chí dùng toàn bộ trình tự hệ gen của vi rút HPV để thống nhất phân loại dòng và dưới dòng [26, 39]. Theo đề xuất của Burk và cộng sự, trình tự toàn bộ hệ gen của vi rút HPV sẽ được sử dụng để phân loại dòng và dưới dòng, trong đó hai chủng vi rút thuộc cùng một tít được phân thành 2 dòng khác nhau khi chúng có 1-10% nucleotit khác biệt và phân thành 2 dưới dòng khác nhau khi chúng có 0,5-1% nucleotit khác biệt [26].

Kết quả so sánh nghiên cứu về trình tự di truyền của vùng LCR và các ORF mã hóa E1, E2, E5, E6 và L1 cho thấy, trong cùng một khu vực địa lý, các biến thể từ cùng một chủng HPV biến đổi rất ít và có tính tương đồng cao, trong khi các biến thể từ các khu vực khác nhau có sự khác biệt cao hơn. Sự tồn tại của những các biến

thể phân tử trong cùng tít HPV đã được chứng minh nhiều năm trước khi so sánh các trình tự LCR của HPV16 lưu hành trên thế giới [77]. Dựa trên các biến đổi phân tử khi so sánh trình tự LCR, HPV16 được phân loại thành năm nhóm (dòng - lineage) chính và dưới dòng (sublineage): Châu Âu (E), Châu Á (As), Người Mỹ gốc Á (AA), Châu Phi 1 (Af-1) và Châu Phi 2 (Af-2). Các dòng hoàn toàn tương ứng với các chủng tộc chính của con người: người Châu Phi (Af-1 và Af-2), người da trắng (E) và người Châu Á (As và AA) [77]. Sự thay đổi giữa các quần thể này giúp giải thích rằng cùng một tít HPV có thể có tỷ lệ nguy cơ phát triển bệnh khác nhau, từ đó lý giải cho sự khác nhau về gánh nặng bệnh tật liên quan đến nhiễm HPV ở các vùng địa lý, dân tộc khác nhau [150]. Các biến thể Châu Phi của HPV (đặc biệt là nhóm các HPV nguy cơ cao) có độc lực cao nhất [68]. Do đó, chưa thể đánh giá được hiệu quả của các vắc xin hiện tại về khả năng sinh miễn dịch với các biến thể HPV khác nhau, đặc biệt trên các biến thể phổ biến ở các nước có thu nhập thấp và trung bình. Với những hiểu biết về các biến thể của HPV, cụ thể là sự đa dạng trong trình tự của cấu trúc vòng lặp L1, các nhà khoa học có thể giải thích một phần lý do tại sao vắc xin HPV sử dụng công nghệ VLP có hiệu quả khác nhau giữa các quốc gia/vùng trên thế giới.

Burk và cộng sự đã phân tích các biến thể của HPV dựa trên hơn 50 bài báo trong vòng 20 năm để đưa ra hệ thống phân loại cùng các trình tự toàn bộ hệ gen đại diện cho các dòng và dưới dòng của tất cả các tít HPV của loài alpha 3,5,6,7,9,10,11 và 13 [26]. Trong đó, phân loại dòng và dưới dòng của 14 tít HPV nguy cơ cao được tổng hợp dưới bảng 1.1 dưới đây.

Bảng 1. 1 Hệ thống phân loại dòng và dưới dòng của 14 tít HPV [26]

Chi	Dưới chi	Tít	Dòng	Dưới dòng
Alpha	Alpha 7	18	A, B, C	A1-A5, B1-B3
		39	A, B	A1-A2
		45	A, B	A1-A3, B1-B2
		59	A, B	A1-A3
		68	A, B, C, D, E, F	A1-A2, C1-C2, D1-D2, F1-F2
	Alpha 9	16	A, B, C, D	A1-A4, B1-B2, D1-D3
		31	A, B, C	A1-A2, B1-B2, C1-C3
		33	A, B, C	A1-A3

Chi	Dưới chi	Týp	Dòng	Dưới dòng
		35	A	A1-A2
		52	A, B, C, D	A1-A2, B1-B2, C1-C2
		58	A, B, C, D	A1-A3, B1-B2, D1-D2
	Alpha 5	51	A, B	A1-A4, B1-B2
	Alpha 6	56	A, B	A1-A2
		66	A, B	B1-B2

1.1.3 Chức năng các gen E6, E7 và L1

1.1.3.1 Chức năng gen E6

Gen E6 mã hóa cho protein E6, gồm khoảng 150 axit amin hình thành cấu trúc Cys-X-X-Cys gắn với kẽm (Zn) điều hòa, mã hóa cho khung đọc mở đầu tiên trong chuỗi gen của HPV và là một trong các protein gây ung thư chính của HPV [171].

Protein E6 của HPV 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 giai đoạn nghỉ của chu kỳ tế bào do sự phá hủy ADN 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) [171].

Tương tác với p53 thông qua sự liên kết giữa E6 với E6AP bằng liên kết ligADN, 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 ADN 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 ADN, 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. 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 vi rút [171].

1.1.3.2 Chức năng gen E7

Protein E7 được mã hóa từ gen E7 gồm 98 axit amin, tuy nhỏ hơn protein E6 nhưng cũng có vai trò quan trọng trong cơ chế gây ung thư ở tế bào chủ [101].

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 kèm 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 [171].

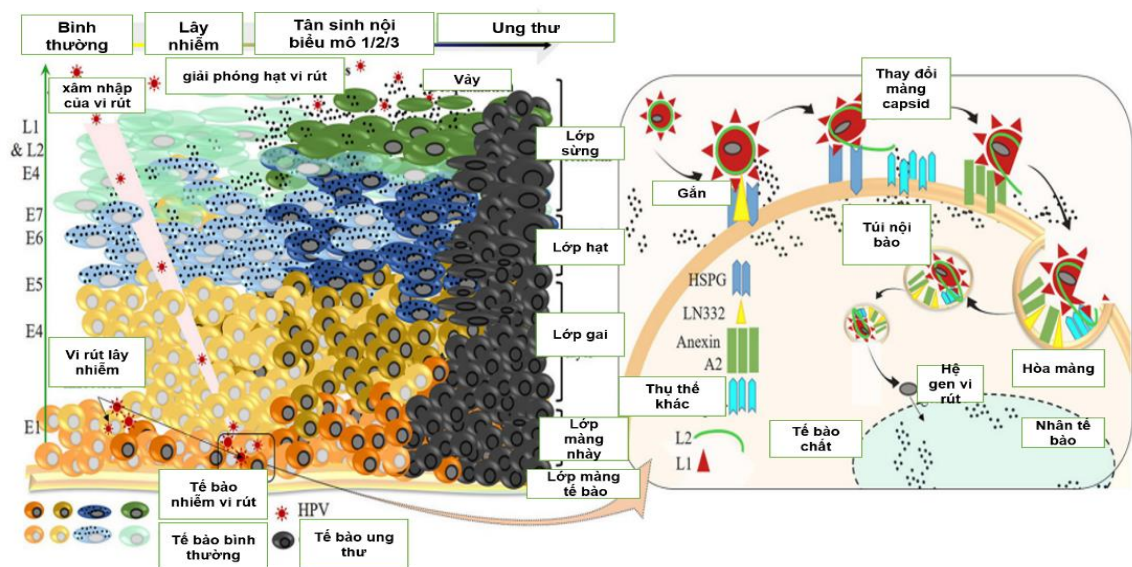
Protein E7 của HPV nguy cơ cao và nguy cơ thấp đều có khả năng gắn kết với protein pocket. Tuy nhiên, sự ưu tiên gắn kết của protein E7 với protein pocket khác nhau giữa hai nhóm HPV. Ái lực liên kết này ở nhóm HPV nguy cơ cao cao gấp 10 lần so với nhóm HPV nguy cơ thấp. Thông thường, pRb bị thủy phân 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 muộn của G1, pRb được phosphorin hóa bởi phức hợp cyclin/cdk, giải phóng phức hợp E2E/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 [171].

1.1.3.3 Chức năng gen L1

L1 là vùng gen cấu trúc mã hóa cho protein capsid chính. Trên kính hiển vi điện tử, lớp capsid của HPV chứa 72 capsome có cấu trúc vòng bảy cạnh trên hàng rào dạng lưới hai mươi mặt với kích thước đường kính khoảng 55nm. Protein L1 là

đối tượng chính của một số nghiên cứu về liệu pháp điều trị HPV vì nó có các vùng ái lực cao với vật chủ, có chức năng kích thích các phản ứng miễn dịch [20], và đặc biệt là khả năng tự lắp ráp thành các hạt giống vi rút gây miễn dịch, không lây nhiễm (VLP). Các cấu trúc vòng có tính sinh miễn dịch là vùng siêu biến đổi của protein L1, đóng một vai trò quan trọng trong sự khác nhau về độc lực giữa các biến thể HPV khác nhau, nguy cơ nhiễm HPV dai dẳng. Hơn nữa, sự biến đổi tự nhiên xảy ra bên trong gen L1 cũng cần được nghiên cứu để áp dụng vào việc sản xuất các loại kháng thể đơn dòng trung hòa đặc hiệu cho từng týp hoặc biến thể HPV [36, 57, 189].

1.1.4 Đặc điểm phân tử lây nhiễm HPV



Hình 1. 3 Chu trình lây nhiễm HPV ở mức độ phân tử và quá trình phát triển ung thư xâm lấn [89]

Đa số nghiên cứu chu trình lây nhiễm của HPV đều dựa trên một vài týp HPV như 16, 18 và 31 bởi quá trình và cơ chế lây nhiễm HPV tương tự nhau giữa các týp và các biến thể HPV. HPV chỉ lây nhiễm ở các tế bào ở tầng sâu chưa biệt hóa của da hoặc lớp màng nhầy (basal layer), có khả năng phân bào cao, được gọi là các tế bào biểu mô đáy. Vi rút hiện diện trên bề mặt đỉnh bên ngoài của da hoặc màng nhầy, và tiếp cận các tế bào mục tiêu thông qua tổn thương của những tế bào lớp trên. Trong một số trường hợp hiếm gặp, đặc biệt là ở niêm mạc tử cung, vi rút có thể tiếp cận

mục tiêu trực tiếp thông qua vùng chuyển đổi giữa biểu mô vảy của lớp ngoài cổ tử cung và biểu mô tuyến của nội tiết không có mô niêm mạc dù không có bất kỳ tổn thương mô hay tế bào (Hình 1.3) [130]. Sự xâm nhập của vi rút vào các tế bào biểu mô chưa biệt hóa phụ thuộc vào các tương tác phân tử liên quan đến các kháng nguyên vi rút và thụ thể của vật chủ. Các nghiên cứu về cấu trúc của L1 cho thấy sự hiện diện của bốn vùng giàu lysine (K) tương tác đặc hiệu với proteoglycan heparan sulfat (HSPG) (Hình 1.1D, E), có vai trò trong quá trình lây nhiễm và nhân lên của HPV [52, 135]. Các vị trí K278 – K361 nằm trên cấu trúc vòng FG và HI của hai pentamer liền kề của protein L1 liên kết với HSPG; ngoài ra cũng xuất hiện những liên kết không đặc hiệu với các thụ thể không phải HSPG [Laminin 332 (LN332)]. Các liên kết này dẫn đến sự thay đổi cấu trúc của cyclophilin B (CyPB) [19], giải phóng đầu N của protein L2, làm cho protein này bị lộ ra và dễ bị ảnh hưởng bởi hoạt động phân giải protein của furin, một protease tế bào còn được gọi là protein convertase [136]. Sự phân giải protein của L2 xảy ra sau hai tương tác của L1 với HSPG, K54 – K356 và N57 – K59/K442 – K443, tương ứng nằm trên bề mặt FG/HI/BC và BC/ α 4 cấu trúc vòng lặp của hai pentamer, dẫn đến sự thay đổi cấu trúc 3D của L1 và L2. Cấu trúc biến đổi dẫn đến mất ái lực của liên kết tham gia vào tương tác đầu tiên, củng cố các liên kết tại vị trí 4 (K442 – K443 của α 4), thúc đẩy sự di chuyển của vi rút lên bề mặt tế bào sừng, và tiếp xúc của các phân tử khác của vi rút với thụ thể thứ hai trong nội bào, bắt đầu quá trình xâm nhiễm. Thông qua quá trình nội bào, vi rút được vận chuyển trong các túi nhỏ đến nhân thông qua mạng lưới nội chất và thể Golgi, nơi một loạt các tương tác và cấu trúc những thay đổi của các túi cho phép tách rời và giải phóng bộ gen của vi rút gần màng nhân. Bộ gen của vi rút đi vào nhân thông qua các lỗ nhân để bắt đầu quá trình nhân lên của vi rút [15, 187]. HPV nhân lên phụ thuộc vào sự biệt hóa của tế bào biểu mô, bằng cách lây nhiễm vào các tế bào đáy chưa biệt hóa, vi rút đảm bảo khả năng nhân lên và nhiễm dai dẳng của nó. Do đó, protein L1 là quan trọng nhất trong quá trình lây nhiễm. Sự có mặt của nhiều vùng kháng nguyên bề mặt có khả năng tăng cường hệ thống miễn dịch chống lại HPV bằng cách tạo ra một lượng lớn các kháng thể đặc hiệu nhận biết HPV. Mặc dù

phương thức lây nhiễm HPV nói chung đều giống nhau nhưng kiểu biểu hiện gen vẫn khác biệt tạo nên sự khác biệt về độc lực do sự thay đổi giữa các biến thể protein L1 [68]. Vì vậy, một phương pháp chủ động để loại trừ nhiễm HPV là phát triển vắc xin đặc hiệu cho protein L1 phân lập ở từng khu vực.

1.1.5 Đặc điểm nhân khẩu học liên quan đến lây nhiễm HPV

Các nghiên cứu đã chỉ ra, nhiễm HPV có liên quan đến một số đặc điểm nhân khẩu học. Nhiễm HPV có thể xảy ra ở mọi lứa tuổi, ngay cả ở lứa tuổi trẻ, khỏe mạnh. Dịch tễ học của HPV khá đa dạng nhưng có mối tương quan tỷ lệ nghịch giữa tuổi tác và tình trạng nhiễm HPV ở nhiều quốc gia. Tuy vậy, ở một số nước nghèo, tỷ lệ nhiễm HPV cao ở tất cả các độ tuổi [67, 72, 163].

Đối với nhóm MSM, một nghiên cứu tại Đan Mạch cho biết, trong số các tốp vi rút xác định được, HPV 16, 18 và 35 có tỷ lệ nhiễm mới cao nhất và gắn liền với quan hệ tình dục (QHTD) lần đầu tiên hoặc thay đổi bạn tình mới và hút thuốc [113]. Tỷ lệ này giảm khi tuổi tăng lên. Một số nghiên cứu khác chỉ ra, tuổi, số lượng bạn tình là những yếu tố nguy cơ chính cho việc nhiễm mới, đặc biệt, nhiễm với nhiều loại HPV nguy cơ cao khác nhau trên đối tượng MSM. Một nghiên cứu tại Vương quốc Anh cho thấy, độ tuổi trung bình của QHTD qua đường hậu môn lần đầu tiên ở MSM là 19. Tỷ lệ nhiễm HPV ở hậu môn cao hơn nhiều ở nhóm MSM so với nhóm quan hệ khác giới (47,2% so với 12,2%) [120].

Đối với nhóm phụ nữ, một số nghiên cứu cũng chỉ ra phụ nữ QHTD sớm (trước 18 tuổi) và QHTD với nhiều người khác nhau sẽ có nguy cơ mắc bệnh UTCTC cao hơn vì khả năng nhiễm vi rút lây qua đường tình dục cao hơn đặc biệt trong đó có vi rút HPV. Tại Việt Nam, nghiên cứu trên 1000 phụ nữ từ 25-55 tại Cần Thơ đã cho thấy tỷ lệ phụ nữ QHTD lần đầu trước 18 tuổi có tỷ lệ nhiễm HPV cao hơn nhóm phụ nữ QHTD lần đầu sau 18 tuổi (11,5% so với 9,5%) [1]. Nghiên cứu cắt ngang tại hai quận thuộc Hà Nội và Thành phố Hồ Chí Minh năm 2010 cho thấy phụ nữ QHTD trước 18 tuổi có nguy cơ nhiễm HPV cao gấp 3 lần so với QHTD sau 18 tuổi [6].

Những phụ nữ lập gia đình nhiều lần hoặc có số bạn tình nhiều là yếu tố nguy cơ lây nhiễm HPV và UTCTC hơn, do đây là sự lây nhiễm qua đường tình dục. Một nghiên cứu của Lâm Đức Tâm năm 2017 tại Cần Thơ khảo sát trên 1490 phụ nữ đã có quan hệ trong độ tuổi từ 18-69 đã cho kết quả là phụ nữ quan hệ với nhiều bạn tình ngoài chồng có nguy cơ nhiễm HPV so với phụ nữ chỉ có quan hệ chồng, trong đó phụ nữ có nhiều hơn 1 bạn tình thì nguy cơ lây nhiễm HPV cao gấp 6 lần so với người không có bạn tình [5]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng có nhiều bạn tình có thể dẫn đến lây truyền HPV cao hơn. Do vậy, PNBD có thể có nguy cơ nhiễm HPV cao hơn so với dân số nói chung.

Nhìn chung các nghiên cứu tại Việt Nam chủ yếu tập trung vào nhóm phụ nữ đã lập gia đình sử dụng các phương pháp lấy mẫu xâm lấn. Tuy vậy, nhóm thanh thiếu niên và người trưởng thành trẻ tuổi ở Việt Nam cũng có những thay đổi nhanh chóng trong thái độ và hành vi tình dục trong ba thập kỷ qua do sự tăng trưởng kinh tế và sự thay đổi mạnh mẽ về chính trị tại Việt Nam. Xu hướng QHTD trước hôn nhân ngày càng tăng giữa các thanh niên trong độ tuổi 15-24 từ 7,6% năm 2003 lên 9,5% trong năm 2008 và tuổi bắt đầu hoạt động tình dục thấp hơn cũng được ghi nhận (19,6 tuổi vào năm 2003 và 18,1 tuổi vào năm 2008) [80].

1.2 Các phương pháp sinh học phân tử chẩn đoán và phân loại HPV

1.2.1 Phương pháp lai phân tử

Phương pháp khuếch đại tín hiệu được sử dụng rộng rãi nhất cho chẩn đoán HPV. Xét nghiệm này sử dụng một ly giải kiềm nhằm giải phóng mẫu ADN phục vụ cho việc lai với hỗn hợp đầu dò gồm các đoạn đầu dò ARN bổ sung với trình tự của các chủng HPV nguy cơ cao. Thử lai giữa ARN-ADN biểu thị sự có mặt của HPV ADN. Sau đó kháng thể đơn dòng đặc hiệu gắn các thử lai ARN-ADN vào đĩa vi lượng. Sau khi làm sạch để loại bỏ các môi gắn không đặc hiệu, các thử lai ARN-ADN sẽ được phát hiện qua các kháng thể đơn dòng kết hợp với alkaline phosphatase. Phức hợp enzyme này sẽ được phát hiện và định lượng bằng việc sử dụng một hệ thống quang hóa. Xét nghiệm bán định lượng này được sử dụng trong lâm sàng như

một cảnh báo về nguy cơ UTCTC. Xét nghiệm này rất dễ thực hiện, dễ dàng đối chiếu giữa các phòng thí nghiệm. Đây là một phương pháp xét nghiệm với chi phí thấp, thích hợp để triển khai ở các nước đang phát triển với yêu cầu tối thiểu về trang thiết bị và đào tạo. Tuy nhiên, xét nghiệm này không phân biệt các chủng HPV có mặt trong mẫu bệnh phẩm, do đó đây không phải là phương pháp tối ưu cho các nghiên cứu dịch tễ học đánh giá hiệu quả của vắc xin đặc hiệu cho các chủng HPV [165].

1.2.2 Phương pháp PCR khuếch đại mục tiêu

Phương pháp khuếch đại mục tiêu được sử dụng phổ biến nhất là PCR (polymerase chain reaction). Theo đó phương pháp PCR đặc hiệu chủng đã được phát triển để phát hiện và định lượng sự có mặt của từng chủng HPV. Đồng thời các giám sát dịch tễ nói chung đòi hỏi phải phát hiện sự có mặt của nhiều chủng HPV quan trọng tìm thấy trong đường sinh dục. Vấn đề này được giải quyết bằng cách khuếch đại một vùng bảo thủ của hệ gen HPV. Xét nghiệm PCR phát hiện tất cả các chủng HPV được đưa ra lần đầu tiên bởi Manos và cộng sự [99]. Xét nghiệm này dùng một tập hợp các đoạn mồi biến đổi MY09/MY11, khuếch đại sản phẩm mục tiêu có kích thước 450bp thuận lợi cho việc định typ bằng các kỹ thuật sinh học phân tử khác, như kỹ thuật RFLP (đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn - Restriction fragment length polymorphism), giải trình tự ADN, và lai đảo ngược với các đầu dò oligonucleotit đặc hiệu chủng. Mồi MY09/MY11 sau đó sẽ được thay thế bằng một nhóm 18 đoạn mồi, PGMY09/11, nhằm tăng độ đặc hiệu (specificity) và độ nhạy (sensitivity). Các cặp mồi bổ sung nhắm tới cùng một vùng mã hóa trong L1 được sử dụng khá rộng rãi, bao gồm GP5+/6+ khuếch đại sản phẩm PCR khoảng 160bp, và SPF10 khuếch đại sản phẩm dài 65bp. Do kích thước sản phẩm PCR nhỏ, các đoạn mồi GP5+/6+ và SPF được lựa chọn để khuếch đại mẫu trong paraffin, nhằm tăng độ nhạy của xét nghiệm vì các axit nucleic trong loại mẫu này thường bị thoái hóa. Các phương pháp PCR thông thường chỉ sử dụng trong định tính (xác định sự có mặt của vi rút) [165].

1.2.3 Phương pháp Realtime-PCR

Realtime-PCR là phương pháp khuếch đại đích có độ nhạy cao, thường được sử dụng trong định tính và định lượng ADN HPV. Đây là phương pháp tốt nhất để chẩn đoán HPV và thời gian thực hiện nhanh chóng. Ngoài ra, realtime-PCR cho phép không chỉ sàng lọc mà còn cho phép nghiên cứu định lượng vi rút HPV.

Multiplex realtime-PCR sử dụng các đầu dò Taqman đặc hiệu cho 20 týp HPV thường gặp bao gồm 14 týp thuộc nhóm nguy cơ cao và 6 týp thuộc nhóm nguy cơ thấp. Multiplex realtime-PCR cho phép phát hiện và định týp HPV có trong các mẫu thử (sinh thiết, quét cổ tử cung, dịch ThinPrep còn lại sau làm phết) một cách đơn giản và nhanh chóng với kết quả đến tay bác sĩ chỉ 4 đến 6 giờ sau khi nhận mẫu.

1.2.4 Phương pháp giải trình tự và dựng cây phát sinh chủng loại

Giải trình tự gen là phương pháp được phát triển gần đây và bắt đầu được ứng dụng trong lĩnh vực chẩn đoán, tầm soát và điều trị. Đối với HPV, phương pháp này có ưu thế lớn khi có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (lần lượt 97,7% và 98,0% đối với mẫu âm đạo, cổ tử cung được lấy bởi nhân viên có chuyên môn nội khoa là 92,1% và 96,4% đối với mẫu âm đạo, cổ tử cung tự lấy bởi người tham gia nghiên cứu) [13].

Trong đó, giải trình tự gen bằng kỹ thuật Sanger là phương pháp cổ điển, có khả năng đọc chính xác đoạn gen có độ dài khoảng 500-800bp. Phương pháp này thường được áp dụng để xác định týp cho những mẫu đã được xác định dương tính với HPV nói chung bằng các phương pháp như PCR với bộ mồi PGMY09/11 hoặc GP5+/6+.

Ngoài ra, giải trình tự gen thế hệ mới (Next generation sequencing – NGS) cũng đang được tiếp cận để chẩn đoán và tầm soát HPV cũng như theo dõi biến đổi di truyền của các chủng trên quần thể. Phương pháp này có khả năng phân tích toàn bộ ADN có mặt trong mẫu bệnh phẩm. Do vậy, nó có thể phát hiện tất cả các chủng HPV có mặt trong mẫu bệnh phẩm đa nhiễm các týp, điều này đặc biệt ý nghĩa khi hiện tượng đa nhiễm các týp HPV vô cùng phổ biến. Hơn nữa, xét nghiệm NGS còn cung cấp dữ liệu đánh giá trạng thái tích hợp của vi rút và phát hiện các biến thể cũng như xác định loại HPV nào chiếm ưu thế trong mẫu bệnh phẩm để có chiến lược điều trị

phù hợp [109]. Một số công nghệ khác nhau như Illumina, pyrosequencing hay ion torrent đã được phát triển cho NGS. Trong đó, giải trình tự Illumina là thế hệ thứ hai, sử dụng 4 nucleotit đánh dấu huỳnh quang. Trong mỗi chu kỳ, một deoxynucleotit đánh dấu huỳnh quang được thêm vào chuỗi axit nucleic và kết thúc phản ứng tổng hợp. Tín hiệu huỳnh quang phát ra được ghi nhận và các bazơ lần lượt được xác định, kết quả cho ra trình tự ADN phân tích [144]. Tuy nhiên phương pháp NGS có nhược điểm là giá thành khá cao so với phương pháp phổ biến khác như realtime-PCR và cần có chuyên gia có chuyên môn để phân tích kết quả trình tự gen cũng như so sánh với các dữ liệu trên ngân hàng gen để đưa ra kết luận cuối cùng.

Cây phát sinh chủng loại là một sơ đồ biểu thị các mối quan hệ tiến hóa giữa các trình tự gen, cùng hình thành từ một tổ tiên chung trong quá khứ. Vì vậy cây phát sinh chủng loại được ứng dụng nhằm tái tạo sự phân hóa trong quá trình tiến hóa giữa các trình tự được xem xét. Từ đó đưa ra mối quan hệ gần gũi về nguồn gốc giữa các trình tự. Có ba phương pháp chính xây dựng cây phát sinh chủng loại bao gồm maximum likelihood, maximum parsimony dựa trực tiếp trên trình tự axit nucleic và phương pháp neighbor joining dựa trên khoảng cách. Phương pháp neighbor joining nhanh, dễ thực hiện nhưng có nhược điểm khi coi tất cả các vị trí nucleotit là ngang nhau mà không xét đến sự khác biệt của tỷ lệ thay thế nucleotit. Trong khi đó, phương pháp maximum likelihood tìm kiếm cây có xác suất hoặc khả năng xảy ra cao nhất. Giá trị bootstrap là tỷ lệ cùng một nhánh được ghi nhận khi lặp lại quá trình dựng cây phân loại trên tập hợp dữ liệu. Với giá trị bootstrap càng cao, xác suất cây phát sinh chủng loại xây dựng được càng chính xác và có độ tin cậy càng cao [83].

1.3 Dịch tễ học của HPV trên thế giới và Việt Nam

1.3.1 Dịch tễ học của HPV đối với MSM trên thế giới và Việt Nam

HPV đang gây ra những gánh nặng bệnh tật trên cả nam và nữ. Tại Hoa Kỳ, ước tính tỷ lệ hiện nhiễm HPV là 15% trên đối tượng nam QHTD khác giới, 60% trên đối tượng MSM và 95% trên đối tượng MSM nhiễm HIV [74, 116]. Một nghiên cứu khác tại Hoa Kỳ trên đối tượng MSM từ 16-27 tuổi và có số lượng dưới 5 bạn tình

cho biết tỷ lệ hiện nhiễm HPV các loại tương ứng 18,5% tại dương vật, 17,1% tại vùng bìu, 33,0% tại vùng đáy, 42,4% trong hậu môn, và 48,0% tại các nơi khác [72]. Một nghiên cứu khác trên 834 đối tượng gay từ 18-26 tuổi với kết quả 69,4% nhiễm HPV hậu môn, 8,4% nhiễm HPV miệng, nhưng chỉ có 8,5% tiêm vắc xin phòng HPV [62]. Tại Vương Quốc Anh, tỷ lệ phát hiện ADN của HPV16 và 18 trong mẫu bệnh phẩm lấy từ đường sinh dục, hậu môn của MSM là 17%, tỷ lệ phát hiện 4 týp HPV 6, 11, 16 và 18 là 32,5% và 45,5% [120].

Tại Trung Quốc, nghiên cứu tại Thẩm Quyển trên đối tượng MSM cho thấy 36,4% nhiễm HPV, trong đó 71,4% nhiễm HPV hậu môn trên nhóm MSM có HIV dương tính với tỷ lệ các týp HPV là HPV6 (8,2%), HPV16 (7,2%), HPV11 (6,4%), HPV18 (4,7%), HPV58 (4,7%), và HPV52 (4,2%) [184]. Một nghiên cứu khác tại Hàn Quốc cũng chỉ ra rằng nhiễm HPV hậu môn ở nhóm MSM là 83,7% và nhóm nam QHTD khác giới là 51,5%, trong đó tỷ lệ nhiễm nhóm HPV nguy cơ cao ở nhóm MSM (47,4%) cao hơn nhóm nam QHTD khác giới (25%). Các bất thường về mô tế bào hậu môn cũng cao hơn ở nhóm MSM so với nhóm nam QHTD khác giới (42,9% và 19,1%). HPV 16 là týp HPV nguy cơ cao chủ yếu liên quan đến UTHM ở nhóm này [31].

Một nghiên cứu tại Thái Lan chỉ ra rằng tỷ lệ nhiễm HPV là 85% trong nhóm MSM nhiễm HIV và 58,5% trên nhóm MSM không nhiễm HIV [73], trong khi một nghiên cứu khác ở phía bắc Thái Lan cho thấy tỷ lệ nhiễm HPV trên đối tượng MSM là 80%, trong đó 70% trường hợp có HIV dương tính. Các týp HPV bị nhiễm phổ biến là HPV16 (27%), HPV58 (23%), và HPV51 (18%). Tại Đài Loan, có 74,2% ADN HPV được tìm thấy trên nhóm MSM trong đó nhiễm týp nguy cơ cao (40,4%), týp nguy cơ thấp (18,2%) và nhiễm nhiều týp (6%) [43, 184].

Ở Việt Nam, trong một nghiên cứu về nam mại dâm 16-35 tuổi giai đoạn 2009-2010, một phần ba đã bị nhiễm các chủng HPV ở miệng, niệu đạo hoặc hậu môn, và tỷ lệ nhiễm cao nhất là ở thành phố Hồ Chí Minh (59%), tiếp theo là Hà Nội (19%) và Nha Trang (6%) [45].

1.3.2 Dịch tễ học của HPV đối với PNBD trên thế giới và Việt Nam

PNBD có nguy cơ nhiễm HPV và UTCTC đặc biệt cao. Một nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng PNBD có nhiều hơn gấp đôi khả năng bị nhiễm HPV hơn phụ nữ trong dân số nói chung và có tỷ lệ tế bào bất thường cao hơn [92, 157]. Nghiên cứu ở Antwerp – Bỉ đã mô tả tỷ lệ nhiễm HPV nguy cơ cao và tế bào bất thường ở phụ nữ mại dâm so với nhóm chứng, nghiên cứu thực hiện trên 1334 mỗi nhóm từ tháng 6 năm 2006 đến tháng 7 năm 2010, kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm HPV nguy cơ cao là 41,7% so với 19,8% ở nhóm đối chứng, tổn thương cổ tử cung ở nhóm PNBD cũng nhiều hơn so với nhóm chứng, trong cả hai nhóm, HPV týp 16 là phổ biến nhất, lần lượt là 12,1% và 6,6% ở nhóm PNBD và nhóm chứng [161]. Nghiên cứu này có kết quả cũng tương tự với 1 bài đánh giá và phân tích kết quả của 35 nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm HPV ở PNBD, tỷ lệ nhiễm HPV trung bình ở PNBD là 42,7% với khoảng từ 2,3-100% [146].

Các nghiên cứu dịch tễ học cho thấy rằng nhiễm HPV ở phụ nữ Việt Nam có tính tập trung cao vào một số quần thể và khu vực cụ thể. Tỷ lệ nhiễm HPV cao nhất trong nhóm PNBD (85%) với 35 kiểu gen HPV khác nhau đã được xác định [76, 79]. Một nửa số phụ nữ bị nhiễm các chủng HPV gây ung thư và 37% bị nhiễm cùng một lúc nhiều kiểu gen HPV khác nhau. Chủng HPV 52 (chủng có nguy cơ gây ung thư cao) khá phổ biến ở quần thể PNBD, chiếm tới 11,4% trong số tất cả các kiểu gen được phát hiện, tiếp theo là các chủng HPV 16, 58, 62, 51 và 18. Trong khi đó, tỷ lệ nhiễm ở nhóm phụ nữ có chồng trong độ tuổi 15-69 là thấp hơn nhiều (5-10%) so với nhóm PNBD. Trong quần thể phụ nữ có chồng, tỷ lệ nhiễm HPV cao nhất ở tuổi 25, và sau đó giảm dần theo tuổi, điều này phản ánh sự thay đổi của hành vi tình dục có nguy cơ trong các nhóm tuổi [125]. Những týp HPV phổ biến nhất được phát hiện ở những phụ nữ đã lập gia đình là HPV16, 18, 58 và 52 [123, 162]. Điều thú vị là mặc dù tỷ lệ mắc UTCTC ở phía Bắc Việt Nam được ước tính là cao hơn đáng kể so với miền Nam nhưng tỷ lệ nhiễm HPV ở phụ nữ đã lập gia đình sống ở miền Nam cũng tương tự như những người sống ở khu vực phía Bắc. Cụ thể là tỷ lệ nhiễm HPV tại thành

phố Hồ Chí Minh và Cần Thơ là 10% và ở các thành phố phía Bắc như Hà Nội, Thừa Thiên Huế và Thái Nguyên là 6-9% [162].

Chủng HPV16, HPV18 chiếm tỷ lệ 80% ở UTCTC, trong khi đó 2 chủng này chỉ chiếm >50% ở các dạng ung thư khác. HPV58, 45 và 51 có tỷ lệ phát hiện cao ở thể ung thư âm đạo, âm hộ, trong khi đó HPV35 có tỷ lệ phát hiện cao ở thể UTHM [8].

Nghiên cứu cắt ngang trên 479 PNBD từ độ tuổi từ 16-52 tại Hải Phòng có kết quả tỷ lệ nhiễm HPV là 51,1%, tỷ lệ này cao so với cộng đồng dân cư, các chủng HPV được xác định gồm: tít HPV thuộc nhóm nguy cơ cao chiếm 75,87%, tít HPV thuộc nhóm nguy cơ thấp chiếm 16,5%, còn lại nhóm chưa xác định nguy cơ [3]. Theo Hoàng Thị Thanh Huyền ở 281 gái mại dâm tại miền Bắc Việt Nam có tỷ lệ nhiễm HPV là 48,8% và 67,6% là tít nguy cơ cao, cao nhất là tít HPV52 [4].

1.3.3 Dịch tể học của HPV đối với sinh viên trên thế giới và Việt Nam

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 trở lên bị nhiễm HPV và khoảng 80% phụ nữ nhiễm HPV ít nhất một lần trong suốt đời sống tình dục của họ [183]. Ở 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%). Châu Phi có tỷ lệ nhiễm HPV ở phụ nữ trẻ tuổi cao hơn 20% so với nhóm dưới 25 tuổi, còn Châu Âu có tỷ lệ nhiễm HPV ở phụ nữ lớn tuổi giảm rõ rệt (15%). Các nghiên cứu của Koutsky (1997) và Syjranen (1990) cho thấy có khoảng 75 đến 80% nam giới và nữ giới trong độ tuổi trưởng thành từng QHTD với người bị nhiễm HPV. Nguy cơ nhiễm HPV sinh dục từ lần QHTD đầu tiên chiếm tỷ lệ rất cao và tập trung ở độ tuổi từ 15 đến 24, theo sau đó sự phơi nhiễm với HPV [129].

1.3.4 Dịch tể học phân tử HPV trên thế giới và Việt Nam

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng các biến thể gen cụ thể đã làm tăng tỷ lệ phổ biến ở một số vùng địa lý trên thế giới và đôi khi tương quan với nhóm dân tộc chiếm đa số ở khu vực địa lý đó. Đáng chú ý nhất là các biến thể của HPV-16 và

HPV-18 hình thành nên cây phát sinh chủng loại loài với nhiều nhánh ngắn ("star phylogenies"). Mỗi nhánh này bao gồm trình tự của các chủng đặc trưng ở châu Phi, châu Âu hoặc Đông Á. Vì vậy, những cây phát sinh chủng loại của HPV gợi nhớ đến quá trình tiến hóa và sự lây lan trên toàn thế giới của vi rút [17] và đưa ra giả thuyết rằng một số biến thể nhất định biến đổi cùng thời điểm với thời điểm hình thành các tộc người trên thế giới. Sự tách biệt rõ ràng trên cây phát sinh chủng loại giữa HPV16 dòng A và các biến thể B/C/D chỉ ra sự phân biệt từ xa xưa giữa vi rút và người cổ đại. Một tập hợp các biến thể của HPV (ví dụ như HPV16 dòng A) có thể là kết quả của việc lan truyền vi rút qua đường tình dục từ người Neanderthals/Denisovan sang quần thể người hiện đại thông qua quá trình lai tạo [125].

Các protein E6 và E7 của HPV góp phần vào quá trình sinh ung thư bằng cách hòa hợp với các protein ức chế khối u p53 và pRb, trong khi đó, L1 đóng vai trò quan trọng trong quá trình lây nhiễm HPV [71]. Nghiên cứu phát sinh chủng loại và đa hình của các biến thể kiểu gen E6, E7 và L1 cho 14 týp HPV cung cấp dữ liệu để hiểu sự tiến hóa của vi rút – vật chủ, cơ chế bệnh sinh của vi rút. Trong một nghiên cứu ở Trung Quốc tại Thượng Hải, cho thấy 79,26% trường hợp nhiễm vi rút loài alpha 9 gây ra tân sinh nội biểu mô cổ tử cung (cervical intraepithelial neoplasia – CIN) được xác nhận về mặt mô bệnh học, 55,49% trong số đó là tổn thương tế bào biểu mô vảy mức độ cao (high grade squamous intraepithelial lesion - HSIL). HPV16 A4, HPV31 A2, HPV33 A1, HPV52 B và HPV58 A1 là các dòng con phổ biến nhất trong vi rút HPV loài alpha 9. Ở Trung Quốc, phân dòng A1-A3 của HPV16 là chiếm ưu thế ở đông bắc Trung Quốc, và A4 là phổ biến ở miền trung và nam Trung Quốc [95, 190]. Trên toàn cầu, nguy cơ UTCTC do các dòng/dưới dòng A3, A4 và D cao hơn đáng kể so với HPV16 A1 [47].

Các biến thể bộ gen ở người và HPV có thể ảnh hưởng đến bất kỳ giai đoạn nào của nhiễm HPV bằng cách tạo ra cổ tử cung ung thư [143]. Đối với E6, biến thể T7220G (D32E) trong HPV16 E6 là một yếu tố nguy cơ làm tăng tỷ lệ mắc bệnh của HSIL, trong khi A388C (K93N) biến thể ở HPV58 E6 giảm đáng kể nguy cơ HSIL. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng tính nhạy cảm với bệnh cổ tử cung là tăng

do tương tác với protein cụ thể HPV16 E6 (L83V)-p53 (Arg-72). Hơn nữa, biến thể gen T350G của HPV16 được thấy là hiển thị hiệu quả hơn thoái hóa Bax và liên kết với protein liên kết E6 [94, 108].

Một nghiên cứu ở Việt Nam cho thấy E7 được bảo tồn trong nhóm HSIL so với nhóm <HSIL và thay thế axit amin N29S trong trình tự của E7 làm tăng đáng kể nguy cơ HSIL. Trong khi dưới dòng HPV16 A4 (và HPV16 E7 29S hiếm khi xuất hiện ở bệnh nhân ung thư so với phụ nữ bị viêm cổ tử cung [124]. Trong khi đó, tỷ lệ HPV16 E7 S63F có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm bệnh và nhóm chứng trong quần thể người Hán, Trung Quốc. Sự thay thế T20I/G63S ở HPV16 A3 E7 làm tăng đáng kể nguy cơ HSIL ở khu vực Thái Châu, Trung Quốc [182, 191].

Lisa Mirabello và cộng sự cũng chỉ ra rằng E7 có ít biến đổi ở nhóm HSIL so với nhóm LSIL và nhóm viêm cổ tử cung. Các biến đổi nucleotit làm thay thế axit amin cũng hiếm gặp trong vùng gen E7 trong các bệnh ung thư khi so sánh với vùng gen E6 [105]. Nghiên cứu của Roman và cộng sự tập trung vào trình tự E7 cũng đưa ra nhận định rằng protein HPV16 E7 dẫn đến UTCTC hầu như không thay đổi [139]. Do vậy, các biến thể E7 làm giảm đáng kể nguy cơ CIN và ung thư xâm lấn.

Khi đánh giá tất cả các biến thể HPV trong chi alpha, Chen và các cộng sự đã chỉ ra rằng, E5 và E4 là hai ORF có sự biến đổi nhiều nhất. Trong khi đó, các protein capsid L1, L2 và E1 là các ORF bảo thủ nhất khi so sánh trình tự axit amin [40]. Tuy nhiên, một số biến đổi trong trình tự axit amin của L1 cũng đã được báo cáo. Ví dụ như biến đổi Y365F trên HPV45 L1 và F458L trên HPV84 L1 có liên quan đến hoạt hóa promoter của HPV, đóng vai trò quan trọng trong điều hòa phiên mã protein [152]. Bên cạnh đó, protein L1 đóng vai trò quan trọng trong lây nhiễm của HPV. Biến đổi trong vùng gen này làm thay đổi ái lực giữa L1 và thụ thể tế bào người, ảnh hưởng tới khả năng lây nhiễm của các biến thể HPV khác nhau. Do vậy nghiên cứu đa dạng kiểu gen của L1 trên quần thể người Việt Nam là vô cùng cần thiết do nó cung cấp dữ liệu về tính độc của các chủng HPV lưu hành cũng như bổ sung thông tin cho các phát triển vắc xin HPV tại Việt Nam.

1.4 Mẫu chuẩn

1.4.1 Khái niệm và thuật ngữ

Mẫu chuẩn là chất/vật liệu được sử dụng như một thước đo trong các thử nghiệm để đánh giá chất lượng mẫu thử. Mẫu chuẩn được đặc trưng bằng quy trình có hiệu lực đo lường đối với một hoặc nhiều tính chất quy định [9].

Mẫu chuẩn là một vật liệu hay một chất mà một hay nhiều tính chất của chúng đủ đồng nhất và được tạo nên để chuẩn hoá một dụng cụ, đánh giá một phương pháp đo hoặc để xác định giá trị đối với các vật liệu. Các giá trị chuẩn trong mẫu chuẩn được tạo nên bởi một quy trình kỹ thuật có giá trị và hoàn hảo nhất. Giá trị chứng chỉ này phải được phê chuẩn bởi cơ quan pháp quy có thẩm quyền. Mẫu chuẩn được sản xuất ra trong các dạng khác nhau và cho các mục tiêu sử dụng khác nhau [166].

Bộ mẫu chuẩn (Bộ mẫu panel chuẩn) sử dụng trong sinh học phân tử là một tập hợp các mẫu được khẳng định đặc tính bộ mẫu bằng các phương pháp chuẩn hoặc sinh phẩm đã lưu hành được sử dụng trong đánh giá chất lượng sinh phẩm chẩn đoán [166].

Chất nền sinh học là vật liệu đơn có nguồn gốc sinh học có thể được lấy mẫu và được xử lý để tái tạo các vật liệu tương tự. Các chất nền sinh học có thể là máu, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, phân, nước bọt, đờm và các mô cơ quan [9, 168].

1.4.2 Phân loại bộ mẫu chuẩn HPV

1.4.2.1 Phân loại theo cấp độ

Chuẩn gốc được xác định là chất được sử dụng rộng rãi và được công nhận các đặc tính, tiêu chuẩn chất lượng thích hợp trong một điều kiện của một kỹ thuật xét nghiệm cụ thể. Các thông số của chất chuẩn gốc được chỉ định sử dụng làm tiêu chuẩn tham chiếu cho một quy trình xét nghiệm xác định mà không cần so sánh với một chất khác [9].

Chuẩn thứ cấp là chất chuẩn có các đặc tính, tiêu chuẩn được xác định hoặc hiệu chuẩn thông qua so sánh, đối chiếu với một chất chuẩn gốc. Mức độ phù hợp

của các đặc tính, tiêu chuẩn của chuẩn thứ cấp có thể không tuyệt đối so với chuẩn gốc. Mức độ phù hợp này có thể được áp dụng cho các mẫu chuẩn làm việc và có thể được cung cấp một cách chính thống dưới dạng chuẩn quốc gia hoặc chuẩn khu vực [165].

1.4.2.2 Phân loại theo phạm vi

a. Mẫu chuẩn Quốc tế

Mẫu chuẩn quốc tế hay các mẫu chuẩn sinh học tham chiếu quốc tế (thường được gọi là Mẫu chuẩn Quốc tế của WHO, IS) là các chất, được phân loại là “sinh học” theo các tiêu chí kỹ thuật, được cung cấp để kiểm soát các kết quả của các xét nghiệm sinh học hoặc xét nghiệm miễn dịch học được thống nhất theo cùng một phương thức trên toàn thế giới và các chuẩn được ấn định giá trị đơn vị quốc tế (IU) hoặc một đơn vị phù hợp khác một cách chính xác sau khi kết thúc hợp tác liên nghiên cứu quốc tế được hoàn thành thiết lập theo khuyến nghị của Tổ chức Y tế thế giới. Các hoạt động thiết lập đơn vị Quốc tế được đưa ra cho các mẫu chuẩn quốc tế thay thế bằng cách so sánh chúng với mẫu chuẩn trước đó vì giả định rằng mẫu chuẩn thiết lập có cùng các đặc điểm miễn dịch học như mẫu chuẩn Quốc tế thay thế. Mẫu chuẩn Quốc tế đóng vai trò là mẫu chuẩn chính để hiệu chuẩn cho các chuẩn quốc gia và mẫu chuẩn thứ cấp khác và được coi là mẫu chuẩn có cao nhất [166].

Panel mẫu chuẩn là một nhóm các mẫu chuẩn được thiết lập để hỗ trợ chung cho việc đánh giá các thử nghiệm hoặc xét nghiệm chẩn đoán. Mẫu panel chuẩn quốc tế tuân theo mọi khía cạnh với các yêu cầu chung đối với các mẫu chuẩn tham chiếu của WHO đưa ra trong các khuyến nghị của WHO về việc chuẩn bị, xác định đặc điểm và thiết lập các mẫu chuẩn quốc tế và các mẫu chuẩn đối chiếu sinh học khác, ngoại trừ trong một số trường hợp, có thể không cần chỉ định các đơn vị cho mỗi thành phần riêng lẻ của panel [166].

Mẫu chuẩn là vật liệu được sử dụng làm chất hiệu chuẩn trong các thử nghiệm và cung cấp cơ sở nhất quán cho các phép đo về nồng độ hoặc hiệu lực. Các chất chuẩn này được cung cấp chủ yếu sử dụng trong các nghiên cứu sinh học, hóa học

hoặc lý học trên động vật điều kiện phòng thí nghiệm. Chất chuẩn được sử dụng trong các kiểm nghiệm để kiểm soát chất lượng sinh phẩm y tế, thuốc hoặc vắc xin [165, 166].

b. Mẫu chuẩn khu vực: Các mẫu chuẩn tham chiếu được thiết lập bởi khu vực hoặc quốc gia các cơ quan có thẩm quyền, hoặc bởi các tổ chức khác, được hiệu chuẩn và có thể nối chuẩn với mẫu chuẩn quốc tế của WHO và được thiết kế để sử dụng trong các thử nghiệm thường quy [166].

c. Mẫu chuẩn in-house (chuẩn nội kiểm): Các mẫu chuẩn tham chiếu được thiết lập bởi cơ quan, các tổ chức hoặc các phòng thí nghiệm... được hiệu chuẩn và có thể nối chuẩn với mẫu chuẩn quốc tế của WHO và được thiết kế để sử dụng trong các thử nghiệm thường quy [166].

1.4.2.3 Phân loại theo mục đích nghiên cứu

a. Mẫu chuẩn sử dụng thiết lập các đặc tính của sinh phẩm chẩn đoán trong nghiên cứu phân tích (analytical performance characteristics)

- Mẫu chuẩn đánh giá độ nhạy (Panel độ nhạy) là mẫu chuẩn được pha loãng gồm một dải nhiều mẫu có các nồng độ khác nhau dùng để đánh giá độ nhạy hay giới hạn phát hiện của bộ sinh phẩm chẩn đoán [168].

- Mẫu chuẩn đánh giá đặc tính kỹ thuật (Panel phân tích): Bao gồm các mẫu được thu thập phù hợp với thử nghiệm của sinh phẩm chẩn đoán sử dụng để đánh giá hoặc các mẫu lâm sàng được xác định đặc tính kiểu gen bởi các xét nghiệm sinh học phân tử thể hiện sự đa dạng của các biến thể trong kiểu gen (ví dụ: panel phù hợp hoặc có kiểu gen tương tự có liên quan đến sinh phẩm chẩn đoán hay có kiểu gen của tít nguy cơ cao...) [168].

- Mẫu chuẩn đánh giá độ đặc hiệu (Panel độ đặc hiệu) còn gọi là mẫu chuẩn âm tính bao gồm các mẫu không pha loãng âm tính với tác nhân đích [168].

b. Mẫu chuẩn sử dụng thiết lập các đặc tính của sinh phẩm chẩn đoán trong nghiên cứu lâm sàng (Clinical performance characteristics).

- Các nghiên cứu lâm sàng được thực hiện trên việc thử nghiệm bộ sinh phẩm chẩn đoán trên các mẫu bệnh phẩm của người.
- Việc sử dụng các mẫu lưu trữ có đặc tính tốt có thể được chấp nhận nếu các mẫu này liên quan đến sinh phẩm chẩn đoán đang được đánh giá, xem xét trên các nội dung bao gồm:
 - + Thiết bị thu thập mẫu (tăm bông, bàn chải hoặc thiết bị thu thập khác; hoặc mẫu tự thu thập); phương tiện thu thập; điều kiện bảo quản.
 - + Tách chiết axit nucleic và tính ổn định của mẫu.
 - + Các thiết kế thử nghiệm yêu cầu chỉ sử dụng được các mẫu tươi [168].

1.4.3 Đặc tính và thành phần các bộ mẫu chuẩn HPV

1.4.3.1 Đặc tính mẫu chuẩn

Mặc dù việc tạo ra các mẫu chuẩn tham chiếu không yêu cầu tuân thủ Thực hành sản xuất tốt, nhưng điều quan trọng là toàn bộ quá trình chuẩn bị mẫu chuẩn phải được kiểm soát và có tài liệu của hệ thống chất lượng. Tất cả các nhân viên vận hành phải được đào tạo và các biến số chính (mẫu thử được sử dụng, thiết bị vận hành và thời gian và chu kỳ xử lý) phải được lập thành văn bản và bất kỳ thiết bị nào được sử dụng cho sản xuất hoặc kiểm tra QC (kiểm soát chất lượng – Quality control) phải được lưu giữ trong chứng nhận có thể ghi lại. Khi đã có thử nghiệm kiểm soát QC, quy trình sản xuất và các thuộc tính của mẫu cần phải được xem xét và được phê duyệt trước khi mẫu chuẩn được phân phối [166].

Các chất chuẩn có thể là chất lỏng đông khô, lỏng hoặc đông băng nếu thích hợp. Dạng đông khô được ưu tiên hơn vì nó cho phép mẫu vận chuyển dễ dàng hơn (thường không cần vận chuyển lạnh) và do đó đảm bảo tính ổn định cao hơn. Tuy nhiên, trong một số trường hợp có thể không thực hiện được quá trình đông khô, nếu không sẽ có thể làm thay đổi cơ chế miễn dịch, các đặc điểm miễn dịch của mẫu hoặc mẫu bị mất hoạt tính không thể sử dụng được, như đông băng và sau đó mất nước có

thể dẫn đến những thay đổi phân tử trong vật liệu sinh học và điều này có thể đặc biệt cấp tính khi vật liệu được bao bọc trong tế bào hoặc vi khuẩn [166].

Khi tiến hành quá trình đông khô, cần cân nhắc đến việc hoàn nguyên sau đó. Nếu có vấn đề trong quá trình hoàn nguyên, có thể tốt hơn là không làm đông khô. Không nên đánh giá thấp sự gia tăng đáng kể trong chi phí xử lý do quá trình đông khô. Nếu không thể hoặc mong muốn đông khô, thì có thể phân phối chất chuẩn lỏng, phụ thuộc vào độ ổn định bảo quản của chất chuẩn đôi chiều [166].

Điều này cần được xác định bằng các nghiên cứu thúc đẩy nhiệt độ; bằng các nghiên cứu ở nhiệt độ bảo quản thực tế và các nghiên cứu về sự suy giảm cấp tốc ở nhiệt độ cao hơn. Cần xem xét tính ổn định liên quan đến hiệu lực và tính toàn vẹn của vật chứa. Có thể mẫu chuẩn sẽ cần được vận chuyển và bảo quản ở điều kiện làm lạnh (2-8°C) để giảm thiểu sự giảm hiệu giá. Trong những trường hợp này, việc đảm bảo các điều kiện của dây chuyền lạnh trong quá trình vận chuyển cần phải được xem xét. Khi độ ổn định nhiệt không đủ để cho phép vận chuyển trong điều kiện lạnh thì nó có thể đông lạnh và vận chuyển chất chuẩn như một chất lỏng đông lạnh, miễn là dây chuyền lạnh đã được xác nhận. Đây là lựa chọn chi phí cao, yêu cầu đóng gói trong đá khô và như vậy chỉ nên được coi là biện pháp cuối cùng. Tuy nhiên, đối với một số vật liệu chẳng hạn như các mẫu chuẩn vi rút lây nhiễm sống nó có thể là lựa chọn khả thi duy nhất [166].

Điều cần thiết là mẫu chuẩn phải được chứng minh là vẫn giữ được tính toàn vẹn, thành phần và hiệu lực hoặc hoạt tính sinh học, bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp. Hoạt động của nó trong các loại xét nghiệm khác nhau mà nó sẽ được sử dụng cần được xác nhận. Các xét nghiệm dựa trên hướng dẫn của WHO hoặc tài liệu tổng hợp (ví dụ: EP hoặc USP) nên được sử dụng khi đánh giá các tiêu chuẩn ứng viên nếu có thể. Các xét nghiệm khác nên được xác nhận hoặc đủ điều kiện khi thích hợp. Nếu một phương pháp đã được nhà sản xuất phát triển và xác nhận và phương pháp đó được chuyển giao cho cơ quan quản lý quốc gia (National Control Laboratory-NCL), thì việc thực hiện và chuyển giao công nghệ hiệu quả cần phải

được chứng minh. Một dải dung dịch pha loãng thích hợp để đưa vào các thử nghiệm cho xác định hàm lượng cần được xác định trong quá trình chuyển giao. Chất chuẩn đối chứng, cho dù được đóng vào lọ hoặc được cung cấp dưới dạng số lượng lớn, phải được thử nghiệm dựa trên các lô mẫu chuẩn từ mỗi nhà cung cấp. Đối với các mẫu chuẩn đông khô, trong một số trường hợp, hoạt tính sinh học có thể bị giảm trong quá trình đông khô [166].

Các chất chuẩn phải được bảo quản ở nhiệt độ thích hợp và nhiệt độ cần giám sát và được ghi lại một cách thường xuyên. Một khu vực lưu trữ thay thế nên có sẵn trong trường hợp của sự cố. Các chất chuẩn có thể được bảo quản ở nhiệt độ đông lạnh hoặc ở 2-8°C nếu thích hợp. Việc sử dụng nên tránh sử dụng tủ đông lạnh có sương vì chu kỳ nhiệt độ thay đổi nhiều hơn. Các vấn đề liên quan đến sự ổn định của mẫu chuẩn đông khô được bảo quản ở -20°C, mẫu chuẩn dạng lỏng được bảo quản ở -20°C hoặc -70°C và mẫu chuẩn được bảo quản ở 2-8°C sẽ khác nhau. Cần phải theo dõi tính ổn định của mẫu chuẩn bằng việc theo dõi sự ổn định của mẫu chuẩn [166].

1.4.3.2 Thành phần các bộ mẫu chuẩn HPV

a. Bộ mẫu chuẩn xác định độ nhạy phân tích

Độ nhạy phân tích (Giới hạn phát hiện): là giới hạn lượng mẫu phân tích ít nhất có trong chất nền đặc trưng có thể cho kết quả dương tính [64, 168].

Bộ mẫu chuẩn xác định độ nhạy phân tích: gồm các mẫu bệnh phẩm dương tính với các týp HPV được pha loãng theo các nồng độ khác nhau từ cao tới thấp, dùng để đánh giá độ nhạy của kỹ thuật hay xác định giới hạn phát hiện (LOD – Limit of detection) của các bộ sinh phẩm chẩn đoán HPV. Theo khuyến cáo của WHO, mẫu chuẩn xác định độ nhạy phân tích nên bao gồm các mẫu trong đó có các kiểu gen của các týp HPV lưu hành ở lãnh thổ/quốc gia đó [64, 167, 168].

b. Bộ mẫu chuẩn xác định độ nhạy lâm sàng

Độ nhạy của một sinh phẩm chẩn đoán là khả năng phát hiện một mẫu bệnh phẩm là dương tính thực sự, được tính bằng tỷ lệ phần trăm số thử nghiệm cho kết

quả dương tính đúng trên tổng số các mẫu dương tính thực sự với chất cần phân tích [64, 168].

Bộ mẫu chuẩn xác định độ nhạy lâm sàng là một tập hợp các mẫu bệnh phẩm đã được xác định dương tính với các týp HPV với các nồng độ khác nhau được dùng để xác định độ nhạy của bộ sinh phẩm chẩn đoán HPV [64, 168].

Bộ mẫu chuẩn xác định độ nhạy lâm sàng gồm các mẫu bệnh phẩm dương tính với các týp HPV, được dùng để đánh giá độ nhạy chẩn đoán (độ nhạy lâm sàng) của các bộ sinh phẩm chẩn đoán HPV. Theo khuyến cáo của Tổ chức y tế Thế giới WHO, bộ mẫu chuẩn nên có ít nhất 60 mẫu bệnh phẩm dương tính với các týp HPV, thu thập từ các vùng địa lý khác nhau, trong đó có các kiểu gen của các týp HPV lưu hành ở lãnh thổ/quốc gia đó [64, 168].

c. Bộ mẫu chuẩn sử dụng xác định độ đặc hiệu phân tích

Bộ mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu phân tích gồm các mẫu âm tính và dương tính với các týp HPV, dùng để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố nhiễu, các tác nhân gây phản ứng chéo tới hiệu quả chẩn đoán của các sinh phẩm, bao gồm cả các yếu tố nội sinh và ngoại sinh [64, 168].

Bộ mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu phân tích: Theo khuyến cáo của Tổ chức y tế Thế giới WHO, bộ mẫu chuẩn được sử dụng đánh giá bao gồm kiểu gen của các týp HPV khác nhau, một số nhóm sinh vật có khả năng phản ứng chéo được tìm thấy trong đường sinh dục hậu môn, các kiểu gen không phải là HPV nhưng cùng một nhóm loài [64, 168].

d. Bộ mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu lâm sàng

Độ đặc hiệu của một sinh phẩm chẩn đoán là khả năng chẩn đoán chính xác một mẫu bệnh phẩm là âm tính thật sự (mẫu không có mặt chất cần phân tích), được tính bằng tỷ lệ phần trăm số thử nghiệm cho kết quả âm tính đúng trên số mẫu âm tính thực sự với chất cần phân tích [64, 168].

Bộ mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu là tập hợp các mẫu huyết thanh đã được xác định âm tính với các týp HPV được dùng để xác định độ đặc hiệu của các bộ sinh phẩm chẩn đoán HPV [64, 168].

Bộ mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu lâm sàng: gồm các mẫu bệnh phẩm lâm sàng được xác định âm tính với các týp HPV, dùng để đánh giá độ đặc hiệu chẩn đoán (độ đặc hiệu lâm sàng) của các bộ sinh phẩm chẩn đoán HPV. Theo khuyến cáo của Tổ chức y tế Thế giới WHO, bộ mẫu chuẩn được sử dụng đánh giá nên có ít nhất 100 mẫu bệnh phẩm âm tính với các týp HPV, thu thập từ các vùng địa lý khác nhau, được lưu hành ở lãnh thổ/quốc gia đó [64, 168].

e. Bộ mẫu chuẩn xác định độ chính xác

Độ chính xác là mức độ tương đồng giữa các kết quả trong nhiều lần lặp lại của 1 mẫu, trong cùng 1 lần chạy và giữa các lần khác nhau vào các ngày khác nhau. Những thí nghiệm này chạy trong các phòng thí nghiệm khác nhau hoặc sử dụng lô sản phẩm khác nhau hoặc trên các trang thiết bị khác nhau.

Bộ mẫu chuẩn xác định độ chính xác gồm ít nhất 4 thành viên: 1 mẫu âm tính, 1 mẫu dương tính thấp (khoảng giá trị ngưỡng), 1 mẫu dương tính trung bình (2-3 giá trị ngưỡng) và 1 mẫu dương tính cao (5-7 giá trị ngưỡng) [64, 168].

1.4.4 Thiết lập các bộ mẫu chuẩn HPV trong sinh học phân tử

Theo khuyến cáo của WHO, để đánh giá chất lượng các loại sinh phẩm chẩn đoán thì mỗi quốc gia cần có bộ mẫu chuẩn. Bộ mẫu chuẩn này tốt nhất được xây dựng trên mẫu bệnh phẩm thu thập và được xác định trên chính cộng đồng dân cư nước sở tại (bao gồm mẫu HPV dương tính với các týp HPV và âm tính đang lưu hành tại nước sở tại). Bộ mẫu chuẩn bao gồm các mẫu đã được xác định đặc tính bởi các xét nghiệm sinh học phân tử với HPV hoặc phân tích trong silico. Bộ mẫu có thể bao gồm sự kết hợp của cả mẫu lâm sàng và mẫu giả định [168].

Các mẫu chuẩn chứa axit nucleic của HPV sẽ được sử dụng là chất chuẩn đối chiếu thích hợp. Căn cứ theo bản chất mẫu, nguồn gốc mẫu, đặc tính và mục đích nghiên cứu...có thể chấp nhận sử dụng các mẫu chuẩn giả định (ví dụ như dòng tế

bào hoặc plasmid được trộn vào tế bào người bình thường trong môi trường nuôi cấy hoặc chất nền lâm sàng âm tính thích hợp) đã được thiết lập dựa trên việc thẩm định và xác định đặc tính cho các nghiên cứu phân tích. Các nghiên cứu lâm sàng sẽ chỉ dựa trên việc thử nghiệm các mẫu bệnh phẩm của con người có nguồn gốc từ nhóm dân số phản ánh mục đích sử dụng và có thể sử dụng các mẫu được lưu trữ có đặc điểm tốt có thể được chấp nhận [168].

Mẫu chuẩn lý tưởng phải bắt chước được các đặc tính của mẫu sinh học được đo lường và cho phép đánh giá toàn bộ quy trình xử lý mẫu đầy đủ trong phòng thí nghiệm. Đối với mẫu chuẩn dùng để đánh giá ADN của HPV tốt nhất phải chứa đầy đủ bộ gen của HPV cho phép xác định bất kỳ vùng gen mục tiêu nào trong các thử nghiệm phát hiện. Trong lịch sử, các mẫu chuẩn quốc tế dưới dạng axit nucleic đã được phân lập từ các vật liệu sinh học bị nhiễm vi rút quan tâm. HPV không phải là một loại vi rút có nguồn gốc từ huyết tương, không có nguồn mẫu dồi dào để tạo ra mẫu chuẩn HPV. Tế bào biểu mô có nguồn gốc từ các vết xước cổ tử cung hoặc các mẫu sinh thiết nhỏ ở bộ phận sinh dục, được dùng để chẩn đoán, chỉ cung cấp số lượng bộ gen HPV thấp và thường chứa nhiều loại HPV. Do đó, các plasmid tái tổ hợp đại diện cho các trình tự ADN nhân bản, hệ gen đầy đủ có mạch kép của các loại HPV được đề xuất làm tiêu chuẩn cho phát hiện HPV. Vật liệu như vậy có thể tái tạo và do đó dễ dàng có sẵn. Một nghiên cứu hợp tác quốc tế đã đánh giá tính khả thi của cách tiếp cận này bằng cách sử dụng nhiều xét nghiệm phát hiện ADN của HPV, và kết quả của việc này nghiên cứu ủng hộ khái niệm ADN HPV tái tổ hợp có thể được sử dụng để phát triển mẫu chuẩn quốc tế [119].

Nhóm nghiên cứu hợp tác quốc tế khuyến nghị rằng việc ưu tiên cho mẫu chuẩn quốc tế dành cho loại HR-HPV 16 và 18 vì có liên quan đến khoảng 70% trường hợp ung thư, và sau đó mở rộng đến các loại HR-HPV có trong vắc xin như HPV 31, 33, 35, 45, 52 và 58 [119]. Đối với ADN của HPV, có thể phát triển tít HPV đơn giá, cho phép xác định chính xác vật liệu ADN HPV và đánh giá tiềm năng can thiệp khi có nhiều loại HPV [119].

Các đoạn mồi PCR hướng vào vùng E6 hoặc E7, mã hóa các protein gây ung thư, được mô tả là có thể thích hợp hơn, trong khi các mồi nhắm mục tiêu vào vùng L1 hoặc E1 có thể bỏ sót bệnh tiến triển, vì vùng L1/E1 là thường bị mất trong quá trình tích hợp ADN của vi rút vào vật chủ ADN bộ gen [119]. Các vật liệu plasmid được đề xuất bởi WHO để được phát triển thành mẫu chuẩn quốc tế thường chứa trình tự bộ gen đầy đủ của vi rút HPV các týp khác nhau và có thể hữu ích trong các thử nghiệm nhắm mục tiêu vào vùng gen muộn và các gen sớm của HPV [119].

Mặc dù các mẫu chuẩn này không được phổ biến rộng rãi tuy nhiên, các nghiên cứu sơ bộ đang được thực hiện để xác minh độ ổn định và độ tin cậy của vật liệu, bao gồm cả việc chuẩn độ plasmid, cũng như tính ổn định của plasmid trong quá trình đông khô. Ngoài ra, nó có thể là tốt nhất để chỉ định các mẫu chuẩn quốc tế bằng cách sử dụng các đơn vị quốc tế, và đơn vị tiêu chuẩn nội phân tử HPV ADN vẫn được thiết lập. Các nghiên cứu trong tương lai cần xác định xem các mẫu HPV ADN cũng có thể đánh giá toàn bộ phổ của các quá trình xử lý mẫu có thể bắt chước mẫu chẩn đoán hay không chuẩn bị bao gồm chiết xuất ADN, kết tủa, hoặc quy trình ly tâm [119].

Việc xây dựng quy trình thiết lập bộ mẫu chuẩn được tiến hành các nội dung như sau thu thập mẫu, bảo quản mẫu, vận chuyển mẫu, sàng lọc mẫu và xác định đặc tính mẫu bằng các kỹ thuật khác nhau...để tạo nên các bộ mẫu chuẩn [119].

1.4.5 Bộ Panel mẫu chuẩn HPV sử dụng trong sinh học phân tử trên thế giới và Việt Nam

Viện Quốc gia các sinh phẩm chuẩn (National Institute for Biological Standards and Control - NIBSC), Vương Quốc Anh đã phát triển mẫu chuẩn quốc tế của Tổ chức y tế thế giới WHO về ADN của vi rút gây u nhú ở người (HPV) để sử dụng trong các xét nghiệm dựa trên công nghệ axit nucleic (NAT) để phát hiện và xác định kiểu gen của HPV. Mẫu chuẩn quốc tế bao gồm các chuỗi ADN HPV có chiều dài đầy đủ cho các loại HPV nguy cơ thấp 6 và 11 và các loại HPV nguy cơ cao 31, 33, 45, 52 và 58 hiện đã có sẵn. Mẫu chuẩn là các chế phẩm không có tế bào, đông khô

của plasmid tái tổ hợp tinh khiết được bào chế trên nền ADN bộ gen người. Các mẫu được phát triển sau khi phát triển thành công mẫu chuẩn Quốc tế của WHO về các loại HPV 16 và 18 nguy cơ cao vào năm 2008 [172].

Mục đích tạo ra các mẫu chuẩn này để thực hiện các nghiên cứu phòng thí nghiệm, tiến hành sàng lọc UTCTC và các nghiên cứu dịch tễ học, các nghiên cứu điều tra tính hiệu quả của vắc xin, các tổ chức nghiên cứu đánh giá sự thành thạo và các nhà sản xuất sinh phẩm chẩn đoán [172].

Hiện tại, trên thế giới những hướng dẫn và nghiên cứu đầy đủ về việc xây dựng và thiết lập bộ mẫu chuẩn chẩn đoán HPV bằng kỹ thuật sinh học phân tử còn rất hạn chế do các vi rút này không nuôi cấy được trong phòng thí nghiệm mà chủ yếu các mẫu chuẩn được công bố chủ yếu được thiết lập bằng công nghệ vector tái tổ hợp [172].

Hiện nay ở Việt Nam chưa có một nghiên cứu chính thức nào về xây dựng bộ mẫu chuẩn HPV cho đánh giá xét nghiệm/sinh phẩm chẩn đoán bằng phương pháp Real-time PCR.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu

a. Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu 1:

Phiếu thu thập thông tin 3 nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018.

Mẫu bệnh phẩm lâm sàng thu thập từ các nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên, 2017-2018 và mẫu bệnh phẩm lâm sàng lưu tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, 2013

b. Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu 2:

Mẫu bệnh phẩm lâm sàng thu thập từ các nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên, 2017-2018 và mẫu bệnh phẩm lâm sàng lưu tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, 2013

2.1.2 Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng:

2.1.2.1 Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng của mục tiêu 1

a. Nhóm nữ sinh viên:

Nữ sinh viên từ 18 tuổi trở lên, đang học trong năm thứ nhất và năm thứ tư tại Đại học Khoa học Tự Nhiên - Đại học Quốc Gia Hà Nội, Đại học Khoa học Xã hội Nhân Văn - Đại học Quốc Gia Hà Nội, Đại học Huế và Đại học Khoa học Tự Nhiên - Đại học Quốc Gia Hồ Chí Minh.

Tự nguyện tham gia nghiên cứu, đồng ý cho lấy mẫu xét nghiệm HPV.

b. Nhóm phụ nữ bán dâm:

Phụ nữ có quan hệ tình dục đối lấy tiền hoặc đồ ít nhất một lần trong tháng vừa qua. Bao gồm PNBD đường phố (gặp khách chủ yếu trên đường phố) và PNBD nhà hàng (gặp khách hàng chủ yếu ở các địa điểm vui chơi giải trí, nhà hàng, tiệm massage hoặc khách sạn) tại Hà Nội và thành phố Hồ Chí Minh.

Từ 18-50 tuổi.

Tự nguyện tham gia nghiên cứu, đồng ý cho lấy mẫu xét nghiệm HPV.

c. Nhóm MSM

MSM có quan hệ tình dục (bằng tay, đường miệng hoặc hậu môn) với người cùng giới ít nhất một lần trong 12 tháng vừa qua tại Hà Nội và thành phố Hồ Chí Minh.

Từ 16-50 tuổi.

Tự nguyện tham gia nghiên cứu, đồng ý cho lấy mẫu xét nghiệm HPV.

d. Mẫu bệnh phẩm HPV lâm sàng lưu tại NIHE

Mẫu lưu của nhóm phụ nữ không bán dâm (nFSW) đã được thu thập và định tít trong đề tài “Nghiên cứu gánh nặng bệnh tật liên quan đến HPV, các yếu tố nguy cơ và dự phòng nhiễm HPV tại cộng đồng một số tỉnh/thành phố của Việt Nam” năm 2013.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Mẫu phết cổ tử cung của nhóm phụ nữ không bán dâm (nFSW)

2.1.2.2 Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng của mục tiêu 2

Các mẫu bệnh phẩm lâm sàng đã xác định được đặc tính từ các nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên, 2017-2018 và mẫu bệnh phẩm lâm sàng lưu tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, 2013.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Thể tích: ≥ 4 ml/mẫu

Mẫu lâm sàng HPV âm tính: Mẫu lâm sàng âm tính HPV trong nghiên cứu và mẫu lâm sàng âm tính lưu tại NIHE: Mẫu lâm sàng đã được sàng lọc âm tính bởi phương pháp PCR với bộ mồi PGMY09/11

Mẫu lâm sàng HPV dương tính: Mẫu lâm sàng dương tính với HPV của nghiên cứu và mẫu lâm sàng dương tính HPV lưu tại NIHE: Mẫu lâm sàng đã được sàng lọc bằng phương pháp PCR với bộ mồi PGMY09/11 và định tít bằng GenoflowTM HPV array (Diagcor, Hong Kong).

2.1.3 Tiêu chuẩn loại trừ

a. Tiêu chuẩn loại trừ đối tượng của mục tiêu 1:

Dưới 18 tuổi (nữ) và dưới 16 tuổi (MSM).

Nảy sinh bất kỳ tình huống nào sau khi tham gia nghiên cứu, mà theo ý kiến của cán bộ nghiên cứu là có thể vi phạm thoả thuận tham gia điều tra, khiến việc tiếp tục tham gia nghiên cứu của đối tượng không an toàn, gây khó khăn cho việc diễn giải kết quả nghiên cứu hoặc gây trở ngại cho việc thực hiện các mục tiêu nghiên cứu.

b. Tiêu chuẩn loại trừ đối tượng mục tiêu 2: Mẫu bệnh phẩm lâm sàng HPV lưu tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương không đủ điều kiện để lựa chọn đưa vào nghiên cứu là mẫu có thể tích <4 ml.

2.1.4 Thời gian, địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: Từ 2018 đến 2022

Địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện tại phòng nghiên cứu phát triển vắc xin và sinh phẩm, Trung tâm nghiên cứu y sinh học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thiết kế nghiên cứu:

Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang

2.2.2 Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

2.2.2.1 Cỡ mẫu nghiên cứu

a. *Cỡ mẫu nghiên cứu mục tiêu 1:* Cỡ mẫu được xác định theo công thức sau:

$$N = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times p \times (1-p)}{d^2} \times DEEF$$

Trong đó:

Z: hệ số tin cậy, với $\alpha=0,05$; $Z(1-\alpha/2) = 1,96$ cho kiểm định 2 phía.

d: độ chính xác tuyệt đối, $d=5\%$

p: tỷ lệ nhiễm HPV ước tính trong quần thể nghiên cứu. Tỷ lệ nhiễm HPV trong nhóm nữ sinh viên dao động từ 4%-20% tùy theo nghiên cứu, PNBD: 50%-85%, MSM: 60% [79, 83, 102].

D: Hệ số thiết kế (design effect)

Dự phòng 5% đối với lỗi xảy ra khi thu thập mẫu hoặc không trả lời câu hỏi phỏng vấn. Dựa theo công thức tính cỡ mẫu trên, cỡ mẫu cụ thể được lựa chọn ở các đối là 1500 đối tượng nữ sinh viên, 700 đối tượng PNBD và 800 đối tượng MSM.

Lựa chọn một số mẫu đại diện cho 14 týp HPV đã được xác định đặc tính mẫu trong nghiên cứu này và mẫu HPV lưu tại NIHE để giải trình tự gen.

b. Cỡ mẫu nghiên cứu mục tiêu 2:

14 mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính với 14 týp HPV nguy cơ cao để tạo ra 14 plasmid tái tổ hợp (chứa một phần trình tự ADN của 14 týp HPV nguy cơ cao), tối thiểu 60 mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính với 14 týp HPV nguy cơ cao, tối thiểu 10 mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính với các týp HPV nguy cơ thấp, tối thiểu 100 mẫu bệnh phẩm lâm sàng âm tính với HPV nguy cơ cao [168].

2.2.2.2 Phương pháp chọn mẫu:

a. Phương pháp chọn mẫu cho mục tiêu 1:

+Nữ sinh viên: Chọn mẫu ngẫu nhiên trên quần thể đối tượng nghiên cứu tiềm năng được lựa chọn để tuyển đủ số lượng nghiên cứu.

+PNBD: Chọn mẫu ngẫu nhiên theo mỗi tụ điểm sau khi xây dựng khung mẫu và lập bản đồ để tuyển đủ số lượng nghiên cứu.

+MSM: Chọn mẫu theo phương pháp chọn mẫu dây chuyền có kiểm soát, có chủ đích để chọn đủ đối tượng vào nghiên cứu.

+ Mẫu nFSW: Chọn mẫu có chủ đích đảm bảo đủ thể tích và đặc tính mẫu cần thiết để đưa vào nghiên cứu.

b. Phương pháp chọn mẫu cho mục tiêu 2:

Chọn mẫu có chủ đích cho đến khi đủ cỡ mẫu cần thiết từ ngân hàng mẫu HPV để đưa vào nghiên cứu và tuyển chọn đủ số lượng mẫu để sử dụng để tạo ra các bộ mẫu chuẩn.

2.2.3 Biến số và chỉ số nghiên cứu

Các biến số và chỉ số nghiên cứu cũng như phương pháp thu thập số liệu/kết quả của nghiên cứu được liệt kê trong bảng 2.1 dưới đây.

Bảng 2. 1 Biến số và chỉ số nghiên cứu

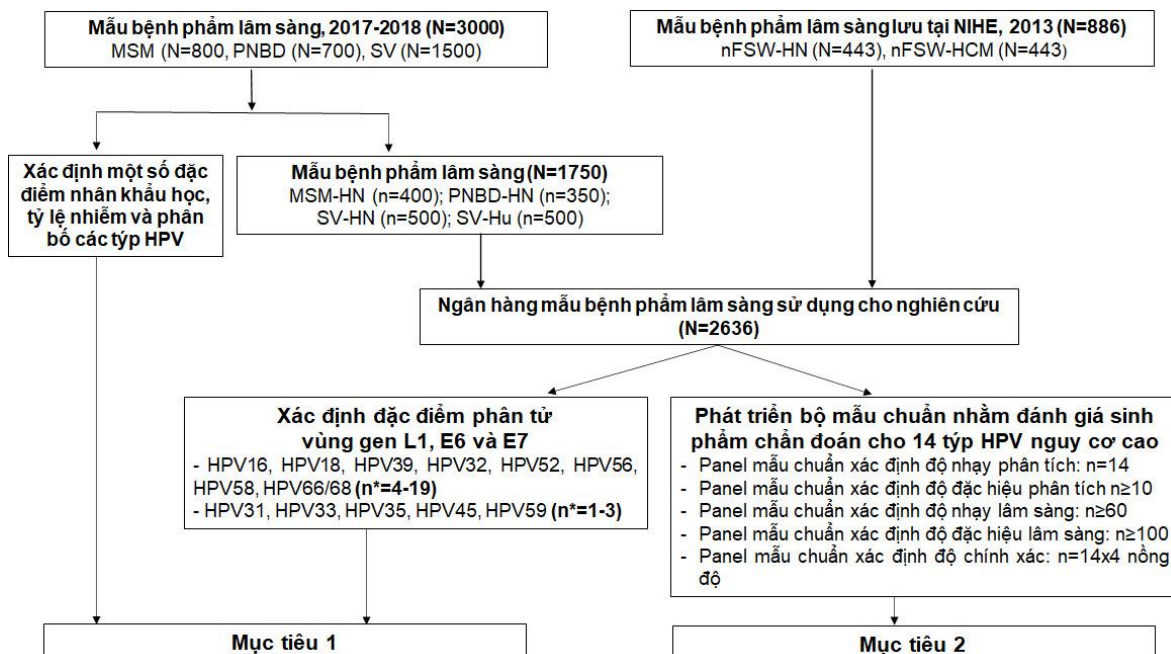
TT	Biến số	Loại biến	Chỉ số	Phương pháp thu thập
1	Nhóm tuổi	Biến định danh	Số tuổi	Bộ câu hỏi
2	Trình độ học vấn	Biến định danh	Bậc học	Bộ câu hỏi
3	Tình trạng hôn nhân	Biến định danh	Kết hôn/ly thân/góa	Bộ câu hỏi
4	Tình trạng sống chung	Biến định danh	Một mình/chung/khác	Bộ câu hỏi
5	Ngành học	Biến định danh	Tự nhiên/xã hội	Bộ câu hỏi
6	Năm học đại học	Biến liên tục	Năm nhất/cuối	Bộ câu hỏi
7	Tỷ lệ nhiễm	Biến rời rạc	Dương tính trên tổng số ca	Sàng lọc và định tít
8	Trình tự gen	Biến rời rạc	Nucleotit	Phân tích trình tự gen
9	Cây phân loại	Biến rời rạc	Nguồn gốc	Dựng cây phân loại
10	Plasmid	Biến rời rạc	Đặc tính	Tạo plasmid
11	Mẫu lâm sàng	Biến rời rạc	Mẫu dương tính/âm tính	Xác định đặc tính mẫu

2.2.4 Kỹ thuật thu thập thông tin

- Sử dụng thông tin đặc điểm nhân khẩu học của các đối tượng nghiên cứu trên phiếu thu thập thông tin.
- Sử dụng các mẫu bệnh phẩm lưu trữ lấy từ dịch phết âm đạo đối với sinh viên, các mẫu phết cổ tử cung đối với PNBD và mẫu phết hậu môn đối với MSM.
- Sử dụng các kỹ thuật xét nghiệm tiến hành sàng lọc, định tít HPV, giải trình tự gen, nhân dòng gen, xác định nồng độ, xác định đặc tính mẫu... để thu nhận các kết quả để đưa vào phân tích thống kê.

2.2.5 Nội dung nghiên cứu

2.2.5.1 Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2. 1 Sơ đồ quá trình thực hiện nghiên cứu

Mẫu bệnh phẩm lâm sàng được thu thập tại Tp. Hà Nội (HN), mẫu bệnh phẩm được thu thập tại Tp. Huế (Hu), mẫu bệnh phẩm được thu thập tại Tp. Hồ Chí Minh (HCM).

Đối với mục tiêu 1: tổng số 3000 mẫu bệnh phẩm được thu thập trong nghiên cứu sàng lọc HPV bằng PCR với bộ môi PGMY09/11. Các mẫu có kết quả PCR dương tính tiếp tục được định týp bằng bộ sinh phẩm GenoFlow™ HPV Array Test Kit (Diagcor, Hong Kong). Từ đó đưa ra được tỷ lệ nhiễm HPV và phân bố các týp HPV trong các mẫu và mối liên quan với một đặc điểm nhân khẩu học của các nhóm đối tượng. Bên cạnh đó, thiết lập ngân hàng mẫu gồm 1750 mẫu của nghiên cứu và 886 mẫu lưu tại NIHE. Một số mẫu đại diện cho 14 týp HPV nguy cơ cao trong ngân hàng mẫu được lựa chọn để tiếp tục tiến hành giải trình tự gen L1, E6 và E7, xây dựng cây phát sinh chủng loại nhằm đưa ra đặc điểm di truyền phân tử của 14 týp HPV nguy cơ cao lưu hành tại Việt Nam.

Đối với mục tiêu số 2: 14 mẫu bệnh phẩm lâm sàng được lựa chọn để xây dựng 14 plasmid tái tổ hợp chứa đoạn gen E6-E7 tương ứng với 14 týp HPV nguy cơ cao. Bên cạnh đó, các mẫu bệnh phẩm lâm sàng đủ thể tích, được khẳng định đặc tính mẫu bằng phương pháp sàng lọc và định týp HPV bằng 2 bộ sinh phẩm tiêu chuẩn được sử dụng để xây dựng các bộ mẫu chuẩn đánh giá sinh phẩm chẩn đoán HPV bằng Realtime PCR. Mỗi bộ mẫu chuẩn bao gồm các Panel mẫu chuẩn thành viên được trình bày ở hình 2.1.

2.2.5.2 Nội dung nghiên cứu

a. Nội dung nghiên cứu mục tiêu 1:

- Nghiên cứu thu thập các thông tin trên phiếu thu thập thông tin của 3000 đối tượng để phân tích các đặc điểm nhân khẩu học.
- Các mẫu bệnh phẩm thu thập từ 3 nhóm đối tượng gồm MSM (N=800), PNBD (N=700), sinh viên (N=1500) được tiến hành sàng lọc HPV bằng PCR với bộ mồi PGMY09/11 và định týp HPV bằng bộ sinh phẩm GenoFlow™ HPV Array Test Kit (Diagcor, Hong Kong).
- Từ kết quả thu thập trên phiếu điều tra và sàng lọc, định týp HPV bằng bộ sinh phẩm GenoFlow™ HPV Array Test Kit (Diagcor, Hong Kong) của các mẫu bệnh phẩm đưa ra thông tin liên quan đến nhân khẩu học và tỷ lệ nhiễm HPV trên các nhóm đối tượng.
- Các mẫu lâm sàng HPV bao gồm các mẫu bệnh phẩm lâm sàng trong nghiên cứu (N=1750) bao gồm các mẫu MSM-HN (n=400), PNBD-HN (n=350), SV-HN (500), SV-Hu (n=500) và các mẫu dịch ngoáy cổ tử cung của phụ nữ không bán dâm (nFSW) (N=886) là các mẫu lưu tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương năm 2013 được đưa vào ngân hàng mẫu bệnh phẩm lâm sàng để phục vụ cho nghiên cứu tiếp theo.
- Lựa chọn một số mẫu đại diện cho 14 týp HPV nguy cơ cao để tiến hành giải trình tự gen, phân tích đặc điểm phân tử gen L1, E6-E7 và xây dựng cây phát sinh chủng loại cho các gen.

b. Nội dung nghiên cứu mục tiêu 2: Các mẫu bệnh phẩm lâm sàng trong ngân hàng mẫu được lựa chọn để phát triển bộ mẫu chuẩn như bảng 2.2.

Bảng 2. 2 Danh mục các bộ mẫu chuẩn được phát triển trong nghiên cứu

TT	Tên BMC	Thành phần	Đặc tính mẫu	Phương pháp
1	BMC xác định độ nhạy phân tích	14 plasmid HPV ADN	Mẫu ADN của 14 plasmid HPV được	Nhân dòng tạo 14 plasmid HPV từ 14 mẫu bệnh phẩm lâm sàng và xác định nồng độ mẫu HPV ADN thu được
2	BMC xác định độ đặc hiệu phân tích	Tối thiểu 10 mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính HPV nguy cơ thấp	Mẫu bệnh phẩm lâm sàng âm tính với 14 týp HPV nguy cơ cao, dương tính các týp HPV nguy cơ thấp	Mẫu bệnh phẩm lâm sàng được sàng lọc và định týp HPV
3	BMC xác định độ nhạy lâm sàng	Tối thiểu 60 mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính HPV	Mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính với 14 týp HPV nguy cơ cao	Mẫu bệnh phẩm lâm sàng được sàng lọc và định týp HPV
4	BMC xác định độ nhạy lâm sàng	Tối thiểu 100 mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính HPV	Mẫu bệnh phẩm lâm sàng âm tính với 14 týp HPV nguy cơ cao	Mẫu bệnh phẩm lâm sàng được sàng lọc và định týp HPV

TT	Tên BMC	Thành phần	Đặc tính mẫu	Phương pháp
5	BMC xác định độ chính xác	4 mẫu (1 mẫu lâm sàng âm tính và 3 mẫu HPV ADN dương tính) cho mỗi týp HPV	14 plasmid HPV ADN x 4 nồng độ mẫu	14 plasmid HPV ADN (10^6) được pha trên nền mẫu lâm sàng âm tính tạo thành 4 nồng độ mẫu

- Trong nghiên cứu này 14 mẫu chuẩn plasmid được tạo ra từ quá trình nhân dòng gen tạo 14 plasmid tái tổ hợp tương ứng và được kiểm tra bằng các kỹ thuật PCR, giải trình tự gen để kiểm tra hiệu quả nhân dòng. 14 mẫu chuẩn này được tiến hành tách chiết thu HPV ADN và xác định nồng độ của mẫu. Từ mẫu nồng độ gốc HPV ADN được sử dụng để pha loãng tạo ra bộ mẫu chuẩn của độ nhạy phân tích và độ chính xác ở nồng độ 10^6 . Đối với các mẫu bệnh phẩm lâm sàng được sàng lọc bằng PCR với bộ mồi PGMY09/11 và xác định đặc tính với HPV bởi 2 bộ sinh phẩm GenoFlow™ HPV Array Test Kit (Diagcor, Hong Kong) và bộ sinh phẩm HPV Genotypes 14 Real™ Quant (Sacase, Como, Ý) được sử dụng làm các mẫu trong bộ mẫu chuẩn cho độ đặc hiệu phân tích (mẫu dương tính HPV nguy cơ thấp), độ nhạy lâm sàng (mẫu dương tính HPV nguy cơ cao), độ đặc hiệu lâm sàng (mẫu âm tính HPV nguy cơ cao) và độ chính xác (mẫu âm tính HPV nguy cơ cao được trộn với HPV ADN) về 4 nồng độ. Các bộ mẫu chuẩn sau khi được phát triển được theo dõi tính ổn định trong vòng 12 tháng trong điều kiện bảo quản thực ở $\leq -20^\circ\text{C}$.

2.2.5.3 Sinh phẩm, hóa chất

- Bộ sinh phẩm tách chiết ADN tự động cador® Pathogen 96 QIAcube® HT kit (Qiagen, Đức), Cat No. 54161
- Bộ sinh phẩm tách chiết plasmid Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega, Hoa Kỳ), Cat No. A1460
- Bộ sinh phẩm GenoFlow™ HPV Array Test Kit (Diagcor, Hong Kong), Cat No. 92007
- Sinh phẩm HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Đức), Cat No. 203645
- Bộ sinh phẩm Genotypes 14 Real™ Quant (Sacase, Como, Ý), Cat No. V67-100FRT
- Bộ sinh phẩm BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, Thermofisher Scientific, Hoa Kỳ), Cat No. 4337455
- Bộ sinh phẩm NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Anh), Cat No. E7645S
- Sinh phẩm AMPure XP beads (Beckman Coulter, Hoa Kỳ), Cat No. A63881
- Sinh phẩm Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kits (Thermofisher Scientific, Hoa Kỳ), Cat No. Q33231
- Bộ sinh phẩm MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles) (Illumina, Hoa Kỳ), Cat No. MS-102-2002
- Bộ sinh phẩm pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Hoa Kỳ), Cat No. 1360
- Sinh phẩm TOP10 Competent Cells (Thermofisher Scientific, Hoa Kỳ), Cat No. C404003
- Sinh phẩm ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Biorad, Hoa Kỳ), Cat No. 1863023
- Thang chuẩn ADN 100 (0,1-2kbp) (Nippongene, Nhật Bản), Cat No. 316-06951
- Agarose, Biobasics, Cat No. AB0013

2.2.5.4 Cơ sở vật chất và trang thiết bị, máy móc

- Phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm
- Buồng điện di
- Tủ an toàn sinh học
- Tủ sinh học phân tử
- Máy tách chiết tự động Qiacube HT (Qiagen, Đức)
- Máy PCR Cyccler (Eppendorf Hoa Kỳ) và Maxygene (Axygen, Hoa Kỳ)
- Máy Realtime Rotor-Gene Q 6plex (Qiagen, Đức)
- Máy soi gel, máy chụp gel (Biorad)
- Hệ thống dòng chảy FT^{PRO} Flow-through System và hệ thống chụp và phân tích kết quả lai phân tử Capture^{PRO} (Diagcor, Hong Kong)
- Máy đo nồng độ acid nucleic: NanoDrop 2000 UV Visible Spectrophotometer và Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, Hoa Kỳ)
- Hệ thống máy tạo vi giọt QX200TM Droplet Generator, máy PCR C1000 Touch Thermal Cyccler và máy đọc vi giọt QX200TM Droplet Reader (Biorad, Hoa Kỳ)
- Máy điện di mao quản Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer (Thermo Scientific, Hoa Kỳ)
- Máy giải trình tự gen Illumina Miseq (Illumina, Hoa Kỳ)
- Tủ lạnh âm sâu -80°C (Sanyo)
- Tủ lạnh -20°C
- Tủ 2-8°C (LG)
- Máy làm đá
- Máy ủ nhiệt có lắc
- Pipettman các loại
- Một số thiết bị nhỏ khác

2.2.6 Quy trình kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu

2.2.6.1 Thu thập và bảo quản mẫu

Các mẫu dịch âm đạo của nữ sinh viên, các mẫu phết cổ tử cung của nFSW, PNBD và các mẫu phết hậu môn từ MSM đã được thu thập và bảo quản trong dung dịch bảo quản mẫu trong dung dịch PreservCyt Solution ở -20°C tại phòng thí nghiệm nghiên cứu phát triển vắc xin và sinh phẩm của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

2.2.6.2 Tách chiết ADN

ADN hệ gen được tách chiết từ mẫu dịch âm đạo của nữ sinh viên, các mẫu phết cổ tử cung của nFSW, PNBD và các mẫu phết hậu môn từ MSM được tách chiết sử dụng bộ sinh phẩm cador Pathogen 96 Qiacube HT trên hệ thống tách chiết tự động Qiacube HT (Qiagen, Hilden, Germany).

Lấy 200µl mẫu bệnh phẩm được ly giải sử dụng 20µl Proteinase K trong 100µl dung dịch VXL trong 10 phút. Sau đó, hút 350µl dung dịch đệm ACB được bổ sung để điều chỉnh điều kiện tối ưu trước khi đưa dung dịch có chứa ADN đã được ly giải lên cột tách chiết. Hệ thống Qiacube HT sử dụng hút chân không để hút bỏ dịch qua cột, ADN được giữ lại. Các protein, muối và chất ức chế được loại bỏ qua 3 bước rửa, lần lượt với dung dịch rửa AW1, AW2 và ethanol 99%. ADN tinh khiết được thu giữ trong 100µl dung dịch AVE bằng bơm hút chân không. ADN được bảo quản ở -20°C và được sử dụng để cho các xét nghiệm sàng lọc và xác định các týp HPV.

2.2.6.3 Sàng lọc HPV bằng phương pháp PCR với bộ mồi PGMY09/11

Đoạn gen vùng L1 được dùng để sàng lọc phát hiện các chủng HPV cùng mẫu chứng nội kiểm (IC-Internal control) từ mẫu bệnh phẩm được khuếch đại trong cùng một phản ứng PCR. Cụ thể là bộ mồi PGMY09/11 dùng để nhân đoạn gen có kích thước 450 bp trên vùng L1 và cặp mồi HLA dùng để nhân lên đoạn 230 bp trên vùng gen HLA của người. Trình tự 5 cặp mồi PGMY11, 12 cặp mồi PGMY09 và cặp mồi HLA được tham khảo theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới WHO [165].

Sinh phẩm HotStarTaq Plus Master Mix 2x (Qiagen, Hilden, Germany) được sử dụng để khuếch đại phản ứng PCR. Thành phần phản ứng gồm H₂O-DEPC, HotStarTaq Plus Master Mix 2x, bộ mồi PGMY09/11 và bộ mồi HLA 0,1 μ M. Chu trình nhiệt của phản ứng như sau: 95°C trong 15 phút; 40 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 56°C trong 1 phút 30 giây, 72°C trong 1 phút) và 72°C trong 5 phút.

2.2.6.4 Định typ HPV sử dụng Genoflow HPV array (Diagcor, Hong Kong)

Các mẫu dương tính với PCR tiếp tục được tiến hành định typ bằng bộ sinh phẩm Genoflow HPV array (Diagcor, Hong Kong). Bộ sinh phẩm này có khả năng phát hiện 33 typ HPV. Trong đó có 14 typ nguy cơ cao là 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66, 3 typ có tiềm năng là nguy cơ cao 53, 73, 82 và 16 typ nguy cơ thấp là 6, 11, 42, 70, 72, 81, 43/44, 54/55, 57/71, 84/26, 40/61. Sản phẩm được thiết kế để xác định loại các vi rút HPV liên quan đến UTCTC dựa trên phản ứng PCR và công nghệ lai phân tử (Flowthrough hybridization).

Đầu tiên sản phẩm ADN có độ dài 450bp thuộc vùng gen L1 của HPV được khuếch đại bằng phản ứng PCR. Thành phần của phản ứng bao gồm: 0,75 μ l enzyme DNA Taq polymerase, 19,25 μ l HPV PCR Premix và 5 μ l mẫu ADN. Chu trình nhiệt của phản ứng như sau: 95°C trong 9 phút; 43 chu kỳ (95°C trong 20 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây) và 72°C trong 5 phút.

Trước khi thực hiện phản ứng lai phân tử, sản phẩm PCR được biến tính ở 95°C trong 5 phút và làm lạnh ngay trên đá trong 2 phút. Chuẩn bị màng lai bằng cách ủ 750 μ l Hybridization Solution trong 2 phút và hút bỏ toàn bộ dịch. Đồng thời, trộn đều 20 μ l sản phẩm PCR và 500 μ l Hybridization Solution trong ống ép 1,5ml và đưa hỗn hợp trên lên màng lai, ủ 41°C trong 5 phút trước khi hút bỏ toàn bộ dịch. Sử dụng 750 μ l Hybridization Solution để rửa màng, lặp lại 3 lần. Điều chỉnh nhiệt độ về 25°C trước khi ủ màng lai 10 phút bằng 1000 μ l Blocking Solution. Sau đó, thực hiện ủ màng lai với 500 μ l Enzyme Conjugate trong 3 phút 30 giây. Loại bỏ enzyme không bám đặc hiệu bằng cách rửa màng lai với A solution. Tiếp đó, bổ sung 500 μ l dung dịch Detection Solution, ủ trong 5 phút trước khi lặp lại 3 lần bước rửa

màng. Cuối cùng, dừng phản ứng hiện màu bằng cách thêm 750 µl dung dịch Stop Solution và ủ trong 1 phút trước khi hút loại bỏ hết dịch cho đến khi khô màng. Cuối cùng, sử dụng hệ thống Capture^{PRO}, DiagCOR, Hồng Kông) để ghi lại và phân tích kết quả cho từng mẫu.

Trong phương pháp này, bộ mồi và đầu dò khuếch đại đoạn gen 268bp thuộc gen β -globin của người được sử dụng đồng thời trong các phản ứng PCR và lai phân tử để tạo đối chứng đánh giá độ chính xác khi tách chiết ADN, hiệu quả của phản ứng PCR và hiệu quả của phản ứng lai.

2.2.6.5 Định típ HPV sử dụng HPV Genotypes 14 RealTM Quant (Sacace, Como, Ý)

Song song với phương pháp định típ HPV sử dụng Genoflow HPV array (Diagcor, Hong Kong), HPV Genotypes 14 RealTM Quant (Sacace, Como, Ý) cũng được sử dụng để phát hiện hoặc định típ 14 típ HPV nguy cơ cao ở người bao gồm HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 và 68. Bộ sinh phẩm sử dụng phương pháp Realtime-PCR cùng với các bộ mồi trong đó có 14 bộ mồi, đầu dò đặc hiệu cho HPV, 1 bộ mồi, đầu dò cho chứng nội kiểm để đánh giá chất lượng lấy mẫu đồng thời xác định các típ HPV có trong mẫu bệnh phẩm. Bộ sinh phẩm chia thành 4 mix, đánh số từ mix 1 đến mix 4. Mix 1 phát hiện 16, 18, 31 và IC. Mix 2 phát hiện 39, 45, 59 và IC. Mix 3 phát hiện 33, 35, 56 và 68. Mix 4 phát hiện 51, 52, 58 và 66. Thành phần phản ứng của mỗi mix bao gồm: H₂O, 10 µl PCR-mix tương ứng mỗi mix từ 1-4, 5 µl hỗn hợp PCR-bufer-FRT và enzyme Hot Start DNA polymerase và 5 µl khuôn DNA. Chu trình nhiệt của phản ứng như sau: 95°C trong 15 phút; 5 chu kì (95°C trong 5 giây, 60°C trong 20 giây, 72°C trong 15 giây) và 40 chu kì (95°C trong 5 giây, 60°C trong 20 giây, 72°C trong 15 giây).

2.2.6.6 Giải trình tự gen L1, E6 và E7 bằng phương pháp Sanger và NGS

Sản phẩm của phản ứng khuếch đại bằng phương pháp PCR được sử dụng làm khuôn để giải trình tự bằng phương pháp Sanger (sử dụng bộ hóa chất BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) hoặc NGS (sử dụng kit NEBNext® UltraTM

II DNA Library Prep Kit for Illumina). Mỗi đoạn trình tự được giải cả chiều xuôi và ngược và so sánh với các trình tự tham khảo trên ngân hàng NCBI. Các vị trí sai khác giữa kết quả mỗi xuôi và ngược hoặc đoạn nhiều sẽ được thực hiện lại thí nghiệm hoặc thiết kế lại mỗi khuếch đại.

Đối với phương pháp Sanger, các cặp mồi xuôi và ngược được thiết kế để khuếch đại và giải trình tự hai chiều các gen E6, E7 và L1 của vi rút, sử dụng bộ sinh phẩm BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher, Hoa Kỳ) và hệ thống máy giải trình tự gen công nghệ điện di mao quản 3130 (Applied Biosystems, Hoa Kỳ). Thành phần của phản ứng bao gồm: H₂O, 1µl BigDye terminator ready reaction mix, 4 µl Big Dye terminator 5X buffer, 0.5 µl mồi đặc hiệu và 5 µl khuôn ADN cần giải trình tự. Chu trình nhiệt của phản ứng như sau: 96°C trong 1 phút, 30 chu kỳ (96°C trong 10 giây, 50°C trong 5 giây, 60°C trong 3 phút) với điều kiện gia nhiệt 1°C/giây. Sản phẩm của phản ứng khuếch đại được rửa bằng cồn 100% lạnh với sự có mặt của EDTA 125mM và Sodium acetate 3M trong 2 giờ và ly tâm với tốc độ 2000g trong 20 phút. Sau đó, phần rửa tiếp tục được làm sạch bằng cồn 100% lạnh trước khi hòa tan bằng 15 µl HiDi formamide, biến tính 95°C trong 5 phút. Sản phẩm cuối cùng được chạy trên hệ thống điện di mao quản 3130 (Applied Biosystems, Hoa Kỳ) cho ra trình tự axit nucleic của các đoạn gen đích.

Với phương pháp NGS, sản phẩm khuếch đại ADN toàn bộ hệ gen của HPV bằng phản ứng PCR ở trên được tinh sạch, tạo thư viện theo hướng dẫn của nhà sản xuất sử dụng bộ sinh phẩm NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit. Đầu tiên, 5ng-3µg sản phẩm ADN được phân cắt thành các đoạn nhỏ sử dụng enzyme dsDNA Fragmentase và thực hiện phản ứng ở 37°C trong 25 phút. Sau đó, sản phẩm của phản ứng được làm sạch sử dụng 1,8X Ampure XP beads trước khi xác định hàm lượng ADN đầu vào cho các bước tiếp theo bằng Qubit 1x dsDNA HS. Sản phẩm ADN sau tinh sạch được sửa chữa đầu 3' (gắn thêm đuôi A) và 5' (phosphoryl hóa axit nucleic) sử dụng hỗn hợp enzyme NEBNext Ultra End prep Enzyme mix trước khi tiến hành gắn adapter ở 2 đầu. Sản phẩm sau khi gắn adapter tiếp tục được tinh sạch, chọn lọc đoạn ADN có kích thước 200-300bp sử dụng AMPure XP beads. Sau đó, ADN có

gắn adapter được nhân bản bằng phản ứng PCR, sử dụng các đầu dò i5 và i7 để phân biệt các mẫu trong cùng một thư viện. Sản phẩm của phản ứng tạo thư viện tiếp tục được tinh sạch, loại bỏ hoàn toàn các đầu dò và thành phần của phản ứng còn dư. Sản phẩm thư viện sau bước tinh sạch được kiểm tra nồng độ bằng Qubit và kiểm tra kích thước bằng điện di trên gel agarose. Cuối cùng, thư viện được đưa vào catridge MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles) (Illumina, Hoa Kỳ) với nồng độ cuối cùng 12pM sau khi biến tính với NaOH và trộn với 5% PhiX trên hệ thống Illumina MiSeq™ System. Kết quả giải trình tự thô bằng phương pháp Sanger hoặc NGS được xử lý, sắp xếp và phân tích thành trình tự hoàn chỉnh sử dụng phần mềm bản quyền Geneious, phiên bản 11.11.5.

2.2.6.7 Phân tích trình tự và xây dựng cây phát sinh chủng loại

Đoạn trình tự khung đọc mở của gen L1, E6-E7 được sử dụng để xây dựng cây phát chủng loại tương ứng. Các trình tự nucleotit của cùng một týp sẽ được sắp xếp, so sánh bằng chương trình Mafft mutiple alignment (MAFFT) phiên bản 1.4.0. Trình tự gen đầu tiên được tìm thấy của mỗi týp được công bố trên thế giới (trình tự gốc - prototype) sẽ được sử dụng để đối chiếu với các trình tự mới phân lập ở Việt Nam. Thông tin về trình tự gen các trình tự của các chủng HPV trên thế giới đã được phân loại thành các dòng và dưới dòng được áp dụng đưa vào để so sánh với các trình tự và xây dựng cây phát sinh chủng loại ở Việt Nam. Các trình tự này được phân loại thành dòng A hoặc dưới dòng A1 nếu có phát sinh dưới dòng (bảng 2.3). Bên cạnh đó, một số trình tự E6-E7 và L1 đại diện cho các dòng/dưới dòng của 14 týp HPV nguy cơ cao đã được công bố trên ngân hàng gen thế giới (NCBI) được tập hợp để dựng cây phân loại.

Bảng 2. 3 Các trình tự gốc của 14 týp HPV nguy cơ cao

STT	Dưới chi	Týp	Trình tự gốc	Phân loại (dòng/dưới dòng)
1	Alpha 7	18	NC001357	A1
2		39	M62849	A1
3		45	X74479	A1
4		59	X77858	A1
5		68	DQ080079	A1

STT	Dưới chi	Týp	Trình tự gốc	Phân loại (dòng/dưới dòng)
6	Alpha 9	16	K02718	A1
7		31	J04353	A1
8		33	M12732	A1
9		35	X74477	A1
10		52	X74481	A1
11		58	D90400	A1
12	Alpha 5	51	M62877	A1
13	Alpha 6	56	X74483	A1
14		66	HPU31794	A

Các trình tự phân lập từ mẫu bệnh phẩm thu thập tại Việt Nam được sắp đúng với trình tự gốc và các trình tự đặc trưng cho từng dòng, dưới dòng tương ứng của từng týp HPV. Từ đó, cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp maximum likelihood với giá trị bootstrap 1000 sử dụng phần mềm MEGA X. Các trình tự E6, E7 và L1 của các phân loại dòng và dưới dòng HPV được tham khảo trên ngân hàng NCBI. Đa hình nucleotit của các khung đọc mở E6, E7 và L1 được phân tích trên cơ sở so sánh các đoạn trình tự giải được của các mẫu phân lập tại Việt Nam so với trình tự tương ứng của prototype, sử dụng phần mềm Geneious, phiên bản 11.11.5.

2.2.6.8 Nhân dòng gen tạo 14 plasmid tái tổ hợp

a. Nhân bản đoạn gen đích

Các đoạn gen đích E6-E7 được nhân lên bằng PCR sử dụng môi đặc hiệu cho từng týp HPV. Thành phần của phản ứng bao gồm: H₂O, 10x PCR buffer, 200 μ M dNTP mix, 0,1 μ M môi xuôi/ngược và 0,5U enzyme HotStarTaq DNA polymerase. Chu trình nhiệt gồm các bước sau: 95°C trong 15 phút; 40 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút) và 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose để chọn đoạn gen đúng kích thước và tinh sạch sử dụng sinh phẩm DNA clean & concentrator-5 (Zymo Research, Hoa Kỳ). Nguồn gốc mẫu, đoạn chèn và thông tin môi sử dụng để PCR và giải trình tự được thể hiện ở bảng 2.4.

Bảng 2. 4 Thông tin mẫu lâm sàng sử dụng trong nhân dòng và trình tự môi đặc hiệu

STT	Dưới chi	Týp	Mẫu bệnh phẩm	Đoạn gen đích	Môi sử dụng để giải trình tự
1	Alpha 7	HPV18	F1142	E6-E7	HPV18F/R
2		HPV39	S2472	E6-E7	HPV39F/R
3		HPV45	S1344	E6-E7	M13F/R
4		HPV59	M1059	E6-E7	HPV59F/R
5		HPV68	F1104	E6-E7	HPV68F/R
6	Alpha 9	HPV16	A248	E6-E7	T7/SP6
7		HPV31	F1022	E6-E7	M13F/R
8		HPV33	F1214	E6-E7	M13F/R
9		HPV35	F1004	E6-E7	HPV35F/R
10		HPV52	F1147	E6-E7	HPV52F/R
11		HPV58	F1182	E6-E7	M13F/R
12	Alpha khác	HPV51	S1464	E6-E7	HPV51F/R
13		HPV56	S1056	E6-E7	M13F/R
14		HPV66	S2222	E6-E7	M13F/R

b. Chèn gen

Tiến hành chèn đoạn ADN mong muốn vào vectơ pGEM-T easy của Promega. Quy trình này được áp dụng để chèn đoạn ADN mong muốn từ sản phẩm tinh sạch

của phản ứng PCR vào vector pGEM-T easy. Các phân tử ADN với đuôi 3'-poly A sẽ bám vào vị trí 3'-T overhang trên vector pGEM-T easy, enzyme T4 ligase sẽ thực hiện phản ứng nối đoạn gen chèn vào vector, sản phẩm thu được sẽ là một vector tròn có kích thước là tổng kích thước của vector nguyên bản (3015bp) và kích thước đoạn gen chèn.

Thành phần của phản ứng chèn gen bao gồm: H₂O, 5µl buffer 2x rapid ligation, 1 µl enzyme T4 ligase, 50ng vector pGEM-T easy và 150ng đoạn gen cần chèn. Phản ứng được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ trước khi ủ qua đêm ở 4°C.

c. Biến nạp

Mẫu plasmid tái tổ hợp cho 14 týp HPV do phòng thí nghiệm tự xây dựng được thiết lập dựa trên các đoạn gen đặc trưng cho 14 týp HPV nguy cơ cao được nhân bản và chèn vào vector pGEM-T easy (Promega, Hoa Kỳ) tạo plasmid tái tổ hợp. Các plasmid này sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* TOP10. Plasmid sau tinh sạch được chọn lọc và kiểm tra dưới bước sóng hấp phụ 260nm để xây dựng bộ mẫu chuẩn. Sau khi được nhân dòng thành công trong tế bào *E. coli*, chủng *E. coli* chứa plasmid tái tổ hợp được cất giữ trong glycerol 20% ở -80°C.

d. Tách chiết plasmid

Tiến hành nuôi cấy chủng *E. coli* chứa plasmid tái tổ hợp trong môi trường LB lỏng để tách chiết plasmid và tiến hành kiểm tra plasmid tái tổ hợp. 3ml dịch *E. coli* nuôi cấy qua đêm (14-16 giờ) được sử dụng để ly tâm, thu tủa tế bào. Quy trình tách plasmid sử dụng bộ sinh phẩm Wizard Plus SV minipreps DNA purification system (Promega) được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phần tủa tế bào được hòa tan trong 250µl dung dịch Cell lysis solution, sau đó tiến hành ly giải tế bào, biến tính protein làm phá vỡ màng tế bào cũng như biến tính ADN genome và ADN plasmid sử dụng 10 µl dung dịch Alkaline protease solution. Sau đó sử dụng 350 µl dung dịch Neutralization solution để trung hòa lại dung dịch làm hồi tính ADN plasmid, trong khi đó ADN hệ gen và các protein bị kết tủa và được phân tách với phần dung dịch có chứa ADN plasmid bằng ly tâm tốc độ cao. Toàn bộ phần dịch được đưa lên cột Spin column, ADN bám lên cột và được rửa loại bỏ hoàn toàn muối

và các protein tạp nhiễm bằng dung dịch Wash solution. Cuối cùng, ADN plasmid được thu giữ trong 50 µl dung dịch AE.

e. Kiểm tra plasmid tái tổ hợp

Sản phẩm ADN plasmid được tiến hành kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho từng đoạn gen và cặp mồi M13F/R. Phản ứng PCR kiểm tra với cặp mồi đặc hiệu cho từng đoạn gen đích và cặp mồi M13F/R được thực hiện sử dụng 2x Green master mix (Promega), nồng độ từng mồi trong phản ứng là 0,5nM. Chu trình nhiệt của phản ứng như sau 95°C trong 2 phút, 30 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút) và 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% sử dụng thang chuẩn 0,1-2kb (Nippongene, Nhật Bản).

Đồng thời, plasmid tái tổ hợp cũng được áp dụng để thực giải trình tự Sanger sử dụng cặp mồi M13F/R để kiểm tra trình tự đoạn gen chèn trong vector. Quy trình thực hiện phản ứng giải trình tự tương tự như mô tả ở mục 2.2.6.6. Bảng thông tin về kích thước đoạn gen chèn và kích thước vector sau khi chèn gen được thể hiện ở bảng 2.5.

Bảng 2. 5 Thông tin kích thước đoạn gen chèn và vector tái tổ hợp

Týp	Đoạn gen chèn vào vector	Kích thước đoạn chèn	Kích thước vector sau khi chèn gen
HPV 16	E6-E7	876	3891
HPV 18	E6-E7	1002	4017
HPV 31	E6-E7	833	3848
HPV 39	E6-E7	946	3961
HPV 45	E6-E7	997	4012
HPV59	E6-E7	835	3850
HPV33	E6-E7	880	3895
HPV35	E6-E7	987	4002

Týp	Đoạn gen chèn vào vector	Kích thước đoạn chèn	Kích thước vector sau khi chèn gen
HPV56	E6-E7	865	3880
HPV58	E6-E7	697	3712
HPV51	E6-E7	955	3970
HPV52	E6-E7	894	3909
HPV66	E6-E7	861	3876
HPV68	E6-E7	964	3979

f. Xác định nồng độ plasmid

14 mẫu plasmid của HPV týp 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 và 68 được tiến hành xác định nồng độ bằng phương pháp PCR kỹ thuật số vi giọt (droplet digital PCR) trên hệ thống máy QX 200, máy tạo vi giọt Manual DG QX200 và đọc vi giọt QX200 (Biorad). Kỹ thuật dựa trên sự phân chia mẫu thành hàng nghìn phản ứng vi mô có thể tích xác định trong giọt dầu. Sau phản ứng PCR, mỗi giọt có thể có hoặc không chứa axit nucleic đích. Từ đó cho phép tính số lượng phân tử trong phản ứng. Kết quả được biểu thị dưới dạng số lượng bản sao của tác nhân đích trên thể tích của phản ứng. Thành phần của phản ứng ddPCR bao gồm: 2x ddPCR supermix for Probes (no dUTP), 0,9 μ M môi, 0,25 μ M đầu dò, 0,25U/ μ l enzyme cắt giới hạn *NotI* và 5 μ l khuôn ADN plasmid cần định lượng. Hỗn hợp phản ứng được đưa lên máy tạo giọt Droplet Generator IVD (Biorad) và thực hiện phản ứng PCR trên máy PCR C1000 Deep Well (Biorad, Hoa Kỳ) theo chu trình nhiệt như sau: 95°C trong 15 phút; 5 chu kì (95°C trong 20 giây, 60°C trong 20 giây, 72°C trong 15 giây) và 40 chu kì (95°C trong 5 giây, 60°C trong 30 giây, 72°C trong 15 giây) và 98°C trong 10 phút. Cuối cùng, kết quả tín hiệu giọt được đọc trên máy Droplet Reader IVD (Biorad Hoa Kỳ).

2.2.6.9 Thiết lập các bộ mẫu chuẩn cho 14 týp HPV nguy cơ cao

Các mẫu các bộ mẫu chuẩn, thành phần, đặc tính và phương pháp đánh giá được phát triển cụ thể như sau:

a. Bộ mẫu chuẩn xác định độ nhạy phân tích:

- Lựa chọn 14 mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính với 14 týp HPV nguy cơ cao từ ngân hàng mẫu đã được tiến hành sàng lọc HPV bằng PCR với bộ mồi PGMY09/11 và xác định đặc tính mẫu (định týp HPV) bằng bộ sinh phẩm GenoFlow™ HPV Array Test Kit (Diagcor, Hong Kong).
- Nhân dòng gen tạo 14 plasmid tái tổ hợp đoạn gen E6-E7 của 14 týp HPV nguy cơ cao theo quy trình nhân bản đoạn gen đích, chèn gen vào vec tơ pGEM-T easy, biến nạp vào tế bào *E.coli* TOP10 để nhân dòng.
- Tách chiết ADN plasmid và kiểm tra sản phẩm sau quá trình nhân dòng gen bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu.
- Tiến hành giải trình tự gen 14 mẫu plasmid để kiểm tra trình tự đoạn chèn trong vector của 14 plasmid HPV và so sánh độ tương đồng với trình tự trên ngân hàng gen để kiểm tra kết quả nhân dòng gen.
- Xác định nồng độ 14 mẫu ADN plasmid bằng phương pháp PCR kỹ thuật số vi giọt (droplet digital PCR).
- Pha loãng 14 mẫu ADN plasmid từ nồng độ gốc về nồng độ làm việc gốc 10^6 bản sao/ μ l bằng dung dịch TE để tạo mẫu chuẩn lưu trữ.
- Chia 14 mẫu ADN plasmid thành 20 ống mẫu (200 μ l/ống) để lưu trữ và bảo quản $\leq -20^\circ\text{C}$.
- Khi tiến hành thử nghiệm kiểm tra độ nhạy phân tích, 14 mẫu ADN plasmid chuẩn có nồng độ làm việc gốc 10^6 bản sao/ μ l sẽ được pha loãng về các độ pha 1000 bản sao/ μ l, 100 bản sao/ μ l, 50 bản sao/ μ l, 10 bản sao/ μ l, 5 bản sao/ μ l, 1 bản sao/ μ l hoặc nồng độ phù hợp bằng dung dịch TE.

b. Bộ mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu phân tích:

- Lựa chọn tối thiểu 10 mẫu bệnh phẩm lâm sàng đã được sàng lọc dương tính với HPV bằng PCR với bộ mồi PGMY09/11

- 10 mẫu dương tính được tiến hành định týp HPV bằng bộ sinh phẩm GenoFlow™ HPV Array Test Kit (Diagcor, Hong Kong) để định týp với HPV nguy cơ thấp.
- 10 mẫu bệnh phẩm lâm sàng sau khi được xác định dương tính HPV nguy cơ thấp được tiến hành kiểm tra lại đặc tính mẫu với 14 týp HPV nguy cơ cao với bộ sinh phẩm HPV Genotypes 14 Real™ Quant (Sacase, Como, Ý).
- Chia mẫu các bệnh phẩm lâm sàng để được 20 ống mẫu (200µl/ống) để lưu trữ và bảo quản $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

c. Bộ mẫu chuẩn xác định độ nhạy lâm sàng:

- Lựa chọn tối thiểu 60 mẫu bệnh phẩm lâm sàng đã sàng lọc dương tính với HPV bằng PCR với bộ môi PGMY09/11 và định týp HPV bằng bộ sinh phẩm GenoFlow™ HPV Array Test Kit (Diagcor, Hong Kong) cho kết quả dương tính với 14 HPV nguy cơ cao.
- 60 mẫu bệnh phẩm lâm sàng được tiến hành kiểm tra khẳng định lại đặc tính mẫu với 14 týp HPV nguy cơ cao bằng bộ sinh phẩm HPV Genotypes 14 Real™ Quant (Sacase, Como, Ý).
- Chia mẫu các bệnh phẩm lâm sàng để được 20 ống mẫu (200µl/ống) để lưu trữ và bảo quản $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

d. Bộ mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu lâm sàng:

- Lựa chọn tối thiểu 100 mẫu bệnh phẩm lâm sàng đã sàng lọc dương tính với HPV bằng PCR với bộ môi PGMY09/11 và định týp HPV bằng bộ sinh phẩm GenoFlow™ HPV Array Test Kit (Diagcor, Hong Kong) cho kết quả âm tính.
- 100 mẫu bệnh phẩm lâm sàng âm tính được tiến hành kiểm tra lại đặc tính mẫu âm tính hoàn toàn với 14 týp HPV nguy cơ cao với bộ sinh phẩm HPV Genotypes 14 Real™ Quant (Sacase, Como, Ý)
- Chia mẫu các bệnh phẩm lâm sàng để được 20 ống mẫu (200µl/ống) để lưu trữ và bảo quản $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

e. Bộ mẫu chuẩn xác định độ chính xác:

- Bộ mẫu chuẩn xác định độ chính xác gồm 04 mẫu thành viên, trong đó có 03 mẫu dương tính ở nồng độ cao, trung bình và thấp và 01 mẫu lâm sàng âm tính.
- Đối với mẫu dương tính được sử dụng tạo bộ mẫu là 14 mẫu ADN plasmid ở nồng độ làm việc gốc 10^6 bản sao/ μ l (200 μ l/ống) đã được lưu trữ và bảo quản $\leq -20^\circ\text{C}$.
- Khi tiến hành thử nghiệm xác định độ chính xác, các mẫu chuẩn tại nồng độ làm việc gốc (10^6 bản sao/ μ l) sẽ được pha loãng về nồng độ mẫu dương tính cao (HPV16/HPV18 là 50 bản sao/ μ l, 12 týp còn lại là 1000 bản sao/ μ l), dương tính trung bình (HPV16/HPV18 là 10 bản sao/ μ l, 12 týp còn lại là 100 bản sao/ μ l) và dương tính thấp (HPV16/HPV18 là 5 bản sao/ μ l, 12 týp còn lại là 50 bản sao/ μ l) sử dụng pha loãng mẫu bằng nền mẫu bệnh phẩm lâm sàng âm tính (dung dịch ADN sau tách chiết của mẫu bệnh phẩm lâm sàng âm tính).

2.2.6.10 Bộ sinh phẩm NIHE – Realtime PCR hrHPV Kit

Bộ sinh phẩm Realtime PCR phát hiện HPV nguy cơ cao NIHE – Realtime PCR hrHPV Kit sử dụng trong xét nghiệm xác định 14 týp HPV nguy cơ cao (týp 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 và 68). Bộ sinh phẩm chẩn đoán này được xét nghiệm trên mẫu dịch phết cổ tử cung, mẫu dịch âm đạo và mẫu ngoáy hậu môn... Bộ sinh phẩm Realtime PCR phát hiện HPV nguy cơ cao NIHE – Realtime PCR hrHPV Kit hoạt động dựa trên nguyên tắc Multiplex Realtime PCR sử dụng đầu dò Taqman, nhân bản vùng gen đặc trưng của các týp HPV nguy cơ cao.

Bộ sinh phẩm Realtime PCR phát hiện HPV nguy cơ cao NIHE – Realtime PCR hrHPV Kit có một chứng nội kiểm là gene hydroxymethylbilane synthase (HMBS) ở người, cho phép kiểm tra sự hiện diện của vật liệu tế bào trong mẫu nhằm tránh hiện tượng âm tính giả. Khác với PCR truyền thống, phương pháp realtime PCR sử dụng một đầu dò phát huỳnh quang (probe) có khả năng phát hiện sản phẩm PCR đặc hiệu trong quá trình tổng hợp sản phẩm. Đầu dò là một đoạn oligonucleotit được gắn với một chất phát tín hiệu huỳnh quang ở đầu 5'(R), đầu kia thì được gắn với chất dập tắt

huỳnh quang (Q). Khi đầu dò còn nguyên vẹn, Q có vai trò nhận năng lượng phát ra từ R (hiệu ứng chuyển năng lượng huỳnh quang). Nếu có trình tự đích, đầu dò và môi sẽ gắn vào khuôn, quá trình tổng hợp bắt đầu. Trong quá trình tổng hợp, enzyme Taq ADN polymerase với hoạt tính exonuclease sẽ cắt các nucleotit của đầu dò từ đầu 5', giải phóng R khỏi Q, làm tăng tín hiệu huỳnh quang của R. Càng nhiều sản phẩm tạo thành thì càng nhiều đầu dò bị phân cắt và tín hiệu của R phát ra càng mạnh. Máy đọc tín hiệu huỳnh quang của máy sẽ thu tín hiệu R, xử lý bằng phần mềm và đưa ra kết quả cuối cùng. Một bộ môi và đầu dò dùng để phát hiện gen HMBS mã hóa cho enzyme hydroxymethylbilane synthase thiết yếu của cơ thể. Gen này được sử dụng là chứng nội kiểm để kiểm soát chất lượng của quá trình tách chiết và đánh giá sự có mặt hay không chất ức chế phản ứng realtime PCR trong mẫu tách chiết.

Bộ sinh phẩm NIHE – Realtime PCR hrHPV Kit được chế tạo đồng thời khi phát triển bộ mẫu chuẩn 14 týp HPV nguy cơ cao trong nghiên cứu này. Bộ sinh phẩm NIHE – Realtime PCR hrHPV Kit được sử dụng như một sinh phẩm đối chứng với kết quả của 2 bộ sinh phẩm tham chiếu sử dụng trong định týp HPV. Do đó, kết quả tính ổn định của bộ mẫu chuẩn được đánh giá đồng thời trên bộ sinh phẩm này giúp cung cấp thêm dữ liệu về độ ổn định của bộ mẫu chuẩn. Bộ sinh phẩm này đã được Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và Sinh phẩm y tế kiểm định độc lập và cấp giấy chứng nhận chất lượng đạt yêu cầu.

2.3 Sai số và cách không chế sai số

Các sai số có thể gặp trong quá trình nghiên cứu như:

Sai số chọn do việc mất đối tượng và sai số thông tin do đối tượng trả lời sai các câu hỏi điều tra và do nhập sai thông tin.

Không chế sai số do đối với sai số thông tin do đối tượng cung cấp thông tin sai thực tế: Rà soát phiếu thu thập thông tin và đối chiếu với dữ liệu trên phần mềm quản lý.

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Phân tích số liệu sử dụng phần mềm SPSS 20. Các trình tự nucleotit của cùng một týp được so sánh bằng phần mềm Mafft multiple alignment (MAFFT) phiên bản 7 để

phân tích đa hình trên các khung đọc mở E6, E7 và L1. Cây phát sinh chủng loại dựa trên phương pháp maximum likelihood sử dụng phần mềm Geneious, phiên bản 11.11.5.

2.5 Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ đầy đủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học. Nghiên cứu đã được phê duyệt về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học tại quyết định số IRB-VN01057_01/2016 phê duyệt ngày 25/1/2016 và 13/HĐĐ phê duyệt ngày 05/9/2013 của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đối với mẫu lưu. Các mẫu này đều có phiếu đồng ý tham gia nghiên cứu và cho phép lưu mẫu để sử dụng cho các nghiên cứu sau, với sự đồng ý của hội đồng y đức. Thông tin cá nhân của đối tượng tham gia đều được bảo mật.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Đặc điểm lưu hành và phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018

Trong số tất cả các mẫu bệnh phẩm thu được trên các nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018 thu được tất cả 2989/3000 mẫu bệnh phẩm từ các nhóm đối tượng đủ điều kiện để đưa vào nghiên cứu. Trong đó, đối với nhóm MSM thu thập được 799 mẫu bệnh phẩm bao gồm 399 mẫu MSM tại Tp. Hà Nội, 400 mẫu MSM tại Tp. Hồ Chí Minh. PNBD thu được 699 mẫu bệnh phẩm trong đó có 349 mẫu của Tp. Hà Nội, 350 mẫu của Tp. Hồ Chí Minh. Đối với nhóm sinh viên thu thập được 1491 mẫu bệnh phẩm lâm sàng của nữ sinh viên với số mẫu ở Tp. Hà Nội là 492 mẫu, Tp. Huế thu được 499 mẫu và tại Tp. HCM thu được 500 mẫu. Các mẫu thu thập từ 3 nhóm đối tượng được tiến hành phân tích tỷ lệ nhiễm HPV, 2017-2018. Sau đó, nghiên cứu lựa chọn trong số những mẫu thu thập từ Hà Nội và Huế và mẫu lưu HPV của nFSW được thu thập từ Tp. Hà Nội và Tp. Hồ Chí Minh đang được lưu trữ ở Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương để phân tích đặc điểm di truyền học phân tử của 14 týp HPV nguy cơ cao và xây dựng cây phát sinh chủng loại của 14 týp này tại Việt Nam.

3.1.1 Đặc điểm nhân khẩu học của một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018

Kết quả nghiên cứu trên 799 đối tượng MSM ở Việt Nam cho thấy nhóm MSM tham gia nghiên cứu chủ yếu nằm trong độ tuổi dưới 25 tuổi (37,1%) và từ 25-35 tuổi (46,2%), tỷ lệ của mỗi nhóm tuổi ở mỗi thành phố cũng khá tương đồng. Trong đó, tại Hà Nội có 41,3% MSM dưới 25 tuổi và 49,4% từ 25-35 tuổi, HCM có 32,8% MSM dưới 25 tuổi và 43,0% từ 25-35 tuổi. Trình độ học vấn của nhóm MSM tại Hà Nội chủ yếu là trung cấp, cao đẳng, đại học và trên đại học (58,9%) và ở HCM phần lớn là THCS trở xuống. Nhìn chung trong nhóm MSM tham gia nghiên cứu, tỷ lệ cao nhất là nhóm trên trung học phổ thông (THPT) (42,4%), THCS trở xuống (57,6%). Hầu hết nhóm MSM tham gia nghiên cứu chưa kết hôn với tỷ lệ 90,1%, ở Hà Nội là

89,0% và HCM là 91,2%. Họ chủ yếu sống một mình (30,5%), sống với bạn (25,7%) và khác (33,8%) (Bảng 3.1)

Bảng 3. 1 Đặc điểm nhân khẩu học của MSM tại Việt Nam

Đặc điểm	Hà Nội n=399		Hồ Chí Minh n=400		Tổng N=799	
	n	%	n	%	n	%
Tuổi trung bình (khoảng tuổi)	24(19-48)		26(18-52)		25(18-52)	
16-24 tuổi	165	41,4	131	32,8	296	31,0
25-35 tuổi	197	49,4	172	43,0	369	46,2
36-40 tuổi	25	6,3	20	5,0	45	5,6
41-50 tuổi	12	3,0	77	19,2	89	11,1
Trình độ học vấn						
Trên THPT*	235	58,9	104	26,0	339	42,4
THPT* trở xuống	164	41,1	296	74,0	460	57,6
Tình trạng hôn nhân						
Chưa kết hôn	355	89,0	365	91,2	720	90,1
Đã kết hôn	7	1,8	4	1,0	11	1,4
Ly dị/ly thân/góa	37	9,2	31	7,8	68	8,5
Tình trạng sống chung						
Một mình	133	33,3	108	27,0	241	30,2
Sống với vợ/bạn tình	29	7,3	54	13,5	83	10,3
Sống với bạn	168	42,1	37	9,3	205	25,7
Khác	69	17,3	201	50,2	270	33,8

* THPT: Trung học phổ thông

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.2 mô tả đặc điểm nhân khẩu học của 699 PNBD tham gia nghiên cứu. Trong đó, độ tuổi trung bình của PNBD là 37 tuổi với nhóm tuổi chủ yếu là trên 30-49 tuổi (42,4%). Tuổi nhỏ nhất là 18 và lớn nhất là 52 tuổi. Trình độ học vấn chủ yếu là Trung học cơ sở với tỷ lệ lần lượt tại Hà Nội và TP. HCM là 45,6%, 35,1%. PNBD chủ yếu là ly thân, ly dị hoặc góa với tỷ lệ 59,9% và chủ yếu họ sống cùng người khác (43,3%). Tỷ lệ đối tượng sống 1 mình ở Hà Nội cao gần gấp đôi TP. HCM (tỷ lệ 43,0% so với 23,1%) (Bảng 3.2).

Bảng 3. 2 Đặc điểm nhân khẩu học của PNBD tại Việt Nam

Đặc điểm	Hà Nội n=349		Hồ Chí Minh n=350		Tổng N=699	
	n	%	n	%	n	%
Tuổi trung bình (khoảng tuổi)	35(18-49)		39(19-52)		37(18-52)	
<20 tuổi	11	3,2	4	1,2	15	2,1
20-29 tuổi	73	20,9	58	16,6	131	18,8
30-39 tuổi	172	49,3	125	35,7	297	42,5
40-49 tuổi	93	26,6	130	37,1	223	31,9
50-59 tuổi	0	0	33	9,4	33	4,7
Trình độ học vấn						
Không đi học	5	1,4	22	6,3	27	3,8
Tiểu học	51	14,6	147	42,0	198	28,3
Trung học cơ sở	159	45,6	123	35,1	282	40,3
THPT/Trung cấp nghề	115	33,0	54	15,4	168	24,0
CD/ĐH/SĐH*	19	5,4	4	1,2	25	3,6
Tình trạng hôn nhân						
Chưa kết hôn	80	22,9	32	9,1	110	16,0
Đã kết hôn	60	17,2	108	30,9	166	24,1
Ly thân/ly dị/góa	209	59,9	210	60	419	59,9
Tình trạng sống						
Sống một mình	150	43,0	81	23,1	231	33,1
Sống cùng người khác	145	41,5	158	45,1	303	43,3
Không ổn định	54	15,5	111	31,8	165	23,6

*CD/ĐH/SĐH: Cao đẳng/Đại học/Sau Đại học

Nghiên cứu được tiến hành trên 1500 đối tượng, tuy nhiên chỉ có 1491/1500 đối tượng đủ tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng để đưa vào nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy, phân bố sinh viên theo năm học khá đồng đều, tỷ lệ sinh viên năm 1 và sinh viên năm 4 khoảng 50%. Tỷ lệ sinh viên học ngành tự nhiên cao gấp gần 2 lần so với sinh viên học ngành xã hội. Hầu hết sinh viên chưa kết hôn (99,7%). Về điều kiện sống, 54,6% sinh viên tham gia nghiên cứu đang sống cùng bạn, 34,3% sống cùng gia đình và 11,1% sống một mình (Bảng 3.3).

Bảng 3. 3 Đặc điểm nhân khẩu học của nữ sinh viên tại Việt Nam

Đặc điểm	Hà Nội		Huế		TP. HCM		Tổng	
	n=492	%	n=499	%	n=500	%	N=1491	%
Tuổi TB*								
(khoảng tuổi)	21(18-24)		21(18-26)		20(18-25)		21(18-26)	
17-18 tuổi	34	6,9	213	42,7	199	39,8	446	29,9
19-20 tuổi	203	41,3	39	7,8	72	14,4	314	21,0
21-22 tuổi	209	42,5	228	45,7	222	44,4	659	44,2
23-24 tuổi	44	8,9	17	3,4	4	0,8	65	4,4
25-26 tuổi	2	0,4	1	0,2	1	0,2	4	0,3
Không xác định	0	0,0	1	0,2	2	0,4	3	0,2
Năm học								
Năm 1	245	49,8	242	48,5	251	50,2	738	49,5
Năm 4	247	50,2	257	51,5	249	49,8	753	50,5
Ngành học								
Tự nhiên	286	58,1	195	39,1	500	100	981	65,8
Xã hội	206	41,9	304	60,9	0	0	510	34,2
Tình trạng hôn nhân								
Chưa kết hôn	491	99,8	495	99,2	500	100	1486	99,7
Đã kết hôn	1	0,2	4	0,8	0	0	5	0,3
Tình trạng sống chung								
Với gia đình/ người thân	122	24,8	196	39,3	193	38,6	511	34,3
Sống với bạn	346	70,3	168	33,7	300	60,0	814	54,6
Một mình	24	4,9	135	27,0	7	1,4	166	11,1

TB*: Trung bình

3.1.2 Tỷ lệ nhiễm HPV ở một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018

Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm HPV được phát hiện bằng phương pháp PCR và định tít bằng bộ sinh phẩm GenoFlow™ HPV array test kit trên 2989 đối tượng nghiên cứu gồm có 799 MSM, 699 PNBD và 1491 nữ sinh viên đại học tại Hà Nội lần lượt là 29,8%, 26,3% và 4,2%. Tỷ lệ đa nhiễm chiếm tỷ lệ cao gấp 2-4 lần đơn nhiễm. Bên cạnh đó, tỷ lệ nhiễm HPV nguy cơ cao được xác định trên 3 nhóm đối tượng nghiên cứu gồm MSM, PNBD và nữ sinh viên đại học tại Việt Nam lần lượt là 24,0%, 17,6 % và 3,4%. Trong đó, tỷ lệ nhiễm HPV16/18 được ghi nhận là 10,6% đối với nhóm MSM, 4,0% cho nhóm PNBD và 0,7% đối với nhóm nữ sinh viên (bảng 3.4).

Bảng 3. 4 Tỷ lệ nhiễm HPV ở các nhóm đối tượng

Nhóm đối tượng	Tổng số mẫu (N)	Thực trạng nhiễm									
		Tất cả HPV		Đa nhiễm		Đơn nhiễm		HPV nguy cơ cao		HPV 16/18	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
MSM	799	238	29,8	187	23,4	51	6,4	192	24,0	85	10,6
Hà Nội	399	106	26,6	76	19,0	30	7,5	76	19,0	36	9,0
HCM	400	132	33,0	111	27,8	21	5,3	116	29,0	49	12,2
PNBD	699	184	26,3	127	18,2	56	8,0	123	17,6	28	4,0
Hà Nội	349	97	27,8	69	19,8	28	8,0	63	18,1	12	3,4
HCM	350	87	24,9	58	16,6	28	8,0	60	17,1	16	4,6
Sinh viên	1491	63	4,2	38	2,5	25	1,7	50	3,4	10	0,7
Hà Nội	492	25	5,1	18	3,7	7	1,4	20	4,1	7	1,4
Huế	499	32	6,4	16	3,2	16	3,2	24	4,8	1	0,2
HCM	500	6	1,2	4	1,2	2	0,4	6	1,2	2	0,4

Bảng 3.5 cho thấy trong tổng số 485 mẫu dương tính với HPV trong đó có 238/799 mẫu dương tính với HPV của nhóm MSM, 184/699 mẫu dương tính với HPV ở nhóm PNBD và 63/1491 mẫu dương tính với HPV ở nhóm sinh viên. Đối với các mẫu MSM, nghiên cứu đã xác định được tất cả 21 týp HPV, PNBD là 26 týp và nữ sinh viên là 22 týp HPV. Tình trạng nhiễm đa týp ở các nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên cao hơn so với đơn týp là 78,6%, 69,0% và 60,3% so với 21,4%, 30,4% và 39,7%. Tỷ lệ phân bố các týp HPV nguy cơ cao trên cả 3 nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên lần lượt chiếm tỷ lệ cao 80,7%, 66,8% và 79,4%. Trong đó, phân bố của HPV16/18 cao nhất ở nhóm MSM là 35,7% tiếp sau là sinh viên và PNBD có tỷ lệ tương ứng là 15,9% và 15,2%.

Bảng 3. 5 Phân bố týp HPV ở các nhóm đối tượng

Nhóm đối tượng	Mẫu nhiễm HPV (N=485)	Phân bố týp HPV											
		Đa nhiễm		Đơn nhiễm		HPV nguy cơ cao		HPV 16/18		Số týp	HPV 66/68 (%)	HPV 52 (%)	HPV 39 (%)
		n	%	n	%	n	%	n	%				
MSM	238	187	78,6	51	21,4	192	80,7	85	35,7	21			
Hà Nội	106	76	71,7	30	19,8	76	71,7	36	34,0		24,1	22,2	23,1
HCM	132	111	84,1	21	15,9	116	87,9	49	37,1				
PNBD	184	127	69,0	56	30,4	123	66,8	28	15,2	26			
Hà Nội	97	69	71,1	28	28,9	63	64,9	12	12,4		17,0	25,0	2,0
HCM	87	58	66,7	28	32,2	60	70,0	16	18,4				
Sinhviên	63	38	60,3	25	39,7	50	79,4	10	15,9	22			
Hà Nội	25	18	72,0	7	32,0	20	80,0	7	28,0		8,0	16,0	24,0
Huế	32	16	50,0	16	50,0	24	75,0	1	3,1		18,8	40,6	12,5
HCM	6	4	66,7	2	33,3	6	100	2	33,3				

Kết quả định týp ở bảng 3.5 được thực hiện trên các mẫu được lấy từ Hà Nội và Huế. Ngoài HPV16/18, 3 týp có tần suất xuất hiện cao nhất trong số các nhóm đối tượng là HPV52, HPV66/68 và HPV39. Tần suất nhiễm týp HPV66/68 (24,1%) là cao nhất trong nhóm MSM theo sau là HPV 39 (23,1%) và HPV52 (22,2%). Đối với nhóm PNBD cho thấy týp HPV52 (25,0%) chiếm tỷ lệ cao nhất theo sau là HPV66/68 (17,0%) và HPV39 (2,0%). Trong nhóm đối tượng nữ sinh viên tại Hà Nội, HPV52 chiếm tỷ lệ cao nhất (24,0%) tiếp theo là HPV39 (16,0%) và HPV66/68 (8,0%). Sinh viên tại Huế cho thấy, tỷ lệ nhiễm HPV52 cao nhất chiếm (40,6%), HPV66/68 (18,8%) và HPV39 (12,5%). Sự phân bố các týp trong cả 3 nhóm đối tượng cho thấy nhiễm các týp nguy cơ chiếm ưu thế, đa nhiễm xuất hiện cao gấp 2-3 lần so với đơn nhiễm. Ngoài HPV16/18, 3 týp có tần số xuất hiện cao nhất là HPV52, HPV 66/68 và HPV39.

3.1.3 Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018

3.1.3.1 Số lượng mẫu HPV phân tích đặc điểm di truyền

Số lượng mẫu ADN của HPV đã được tách chiết, khuếch đại, giải trình tự và phân tích đặc điểm di truyền được tổng kết trong bảng 3.6. Nghiên cứu đã tiến hành giải trình tự gen trên tổng số 82 mẫu HPV đại diện cho 14 týp HPV nguy cơ cao. Trong số 82 mẫu tiến hành giải trình tự trên cả gen L1 và E6-E7 có 52/82 mẫu được giải trình tự thành công toàn bộ các gen, 30/82 mẫu mới chỉ giải trình tự được một gen. Trong số các trình tự được phân tích có tổng cộng có 59 đoạn trình tự L1 và 75 đoạn trình tự E6 và E7 (E6-E7) của 14 týp HPV nguy cơ cao được phân tích so sánh trình tự với các chủng đã được công bố trên thế giới.

Bảng 3. 6 Số lượng các trình tự L1, E6-E7 tiến hành phân tích

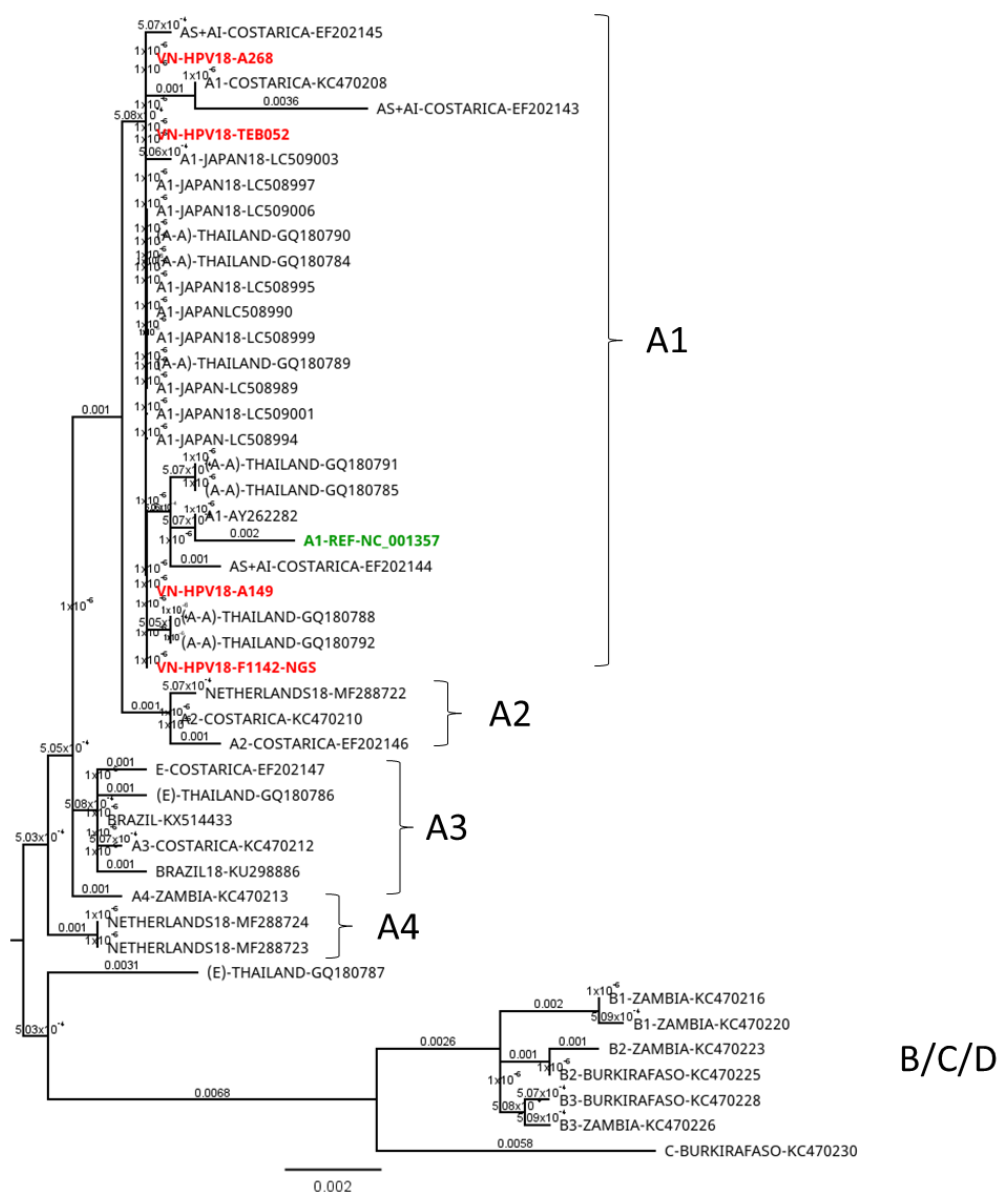
STT	Dưới chi	Týp	Số mẫu nghiên cứu	Số mẫu phân tích đồng thời L1 và E6-E7	Số lượng trình tự	
					L1	E6-E7
1	Alpha 7	18	9	4	4	9
2		39	4	3	3	4
3		45	1	0	0	1
4		59	3	3	3	3
5		68	8	3	5	6
6	Alpha 9	16	11	8	9	11
7		31	1	1	1	1
8		33	4	2	3	2
9		35	2	2	2	2
10		52	19	15	15	19
11		58	4	2	2	4
12	Alpha khác	51	7	3	4	6
13		56	5	4	4	5
14		66	4	2	4	2
Tổng	3	14	82	52	59	75

3.1.3.2 Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018

i. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của các týp HPV thuộc dưới chi alpha 7

a. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV18

Gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 4 và 9 chủng HPV18. Dựa vào 2 đoạn gen này, các chủng HPV18 trong nghiên cứu này đều thuộc dòng A1, giống với các chủng tìm thấy ở Nhật Bản, Thái Lan và Costa Rica. Dựa vào trình tự gen L1 với độ dài 1707bp, dưới dòng A1 có 0-3 nucleotit (0-0,2%) khác biệt trong cùng dưới dòng A1, và 3-6 nucleotit (0,2-0,4%) khác biệt với A2/A3/A4 và 15-22 nucleotit (0,9-1,3%) khác biệt so với B/C/D (Hình 3.1 và Hình 3.2).



Hình 3. 1 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV18

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype NC001357 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



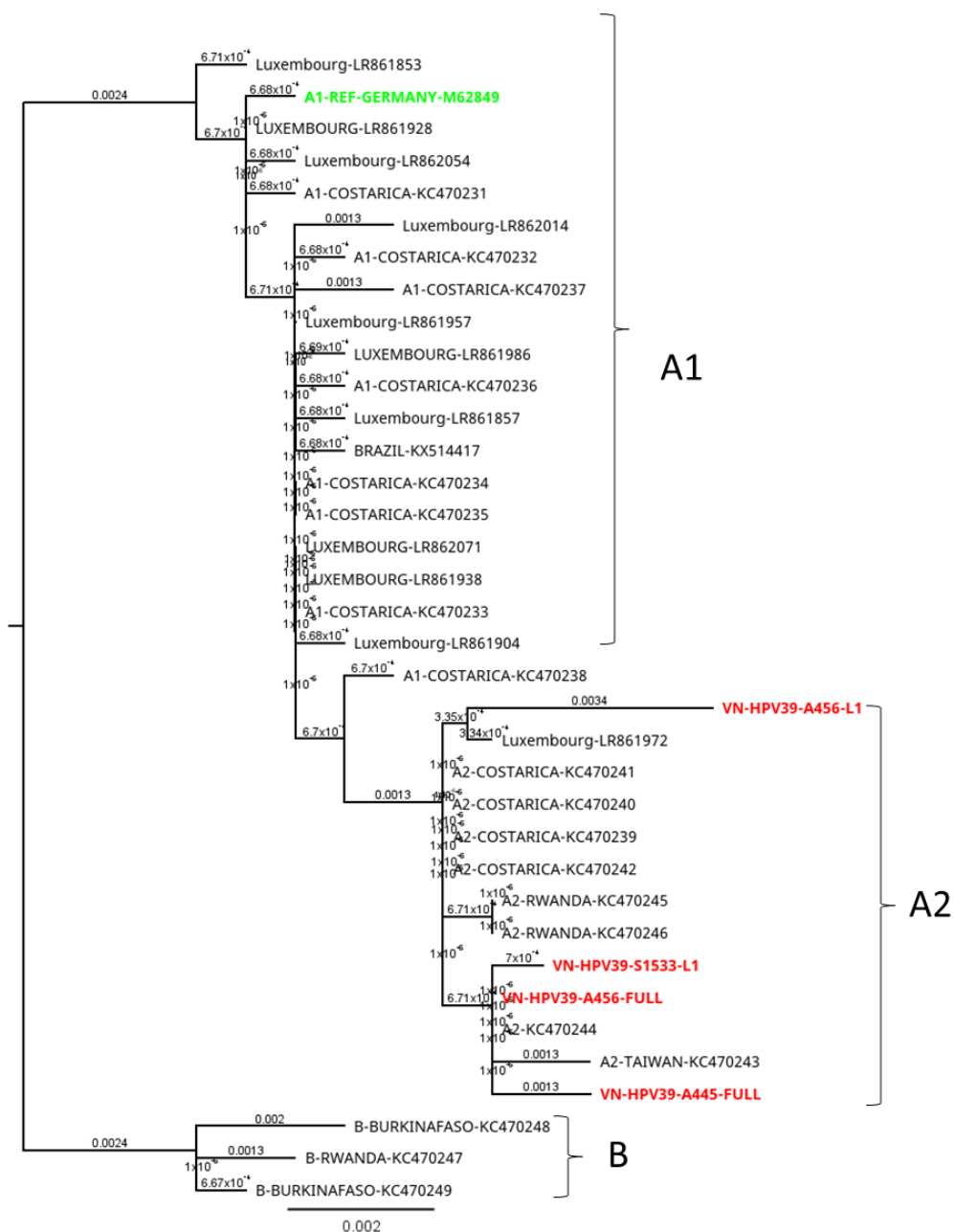
Hình 3. 2 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV18

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype NC001357 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

Tỷ lệ khác biệt này cao hơn đối với đoạn gen E6-E7. Dựa vào trình tự gen E6-E7 với độ dài 795bp, dưới dòng A1 có 0-5 nucleotit (0-0,6%) khác biệt trong cùng dưới dòng A1, 2-10 nucleotit (0,3-1,3%) khác biệt với A2/A3/A4, 10-15 nucleotit (1,3-1,9%) khác biệt so với B và 8-12 nucleotit (1,0-1,5%) khác biệt so với dưới dòng C.

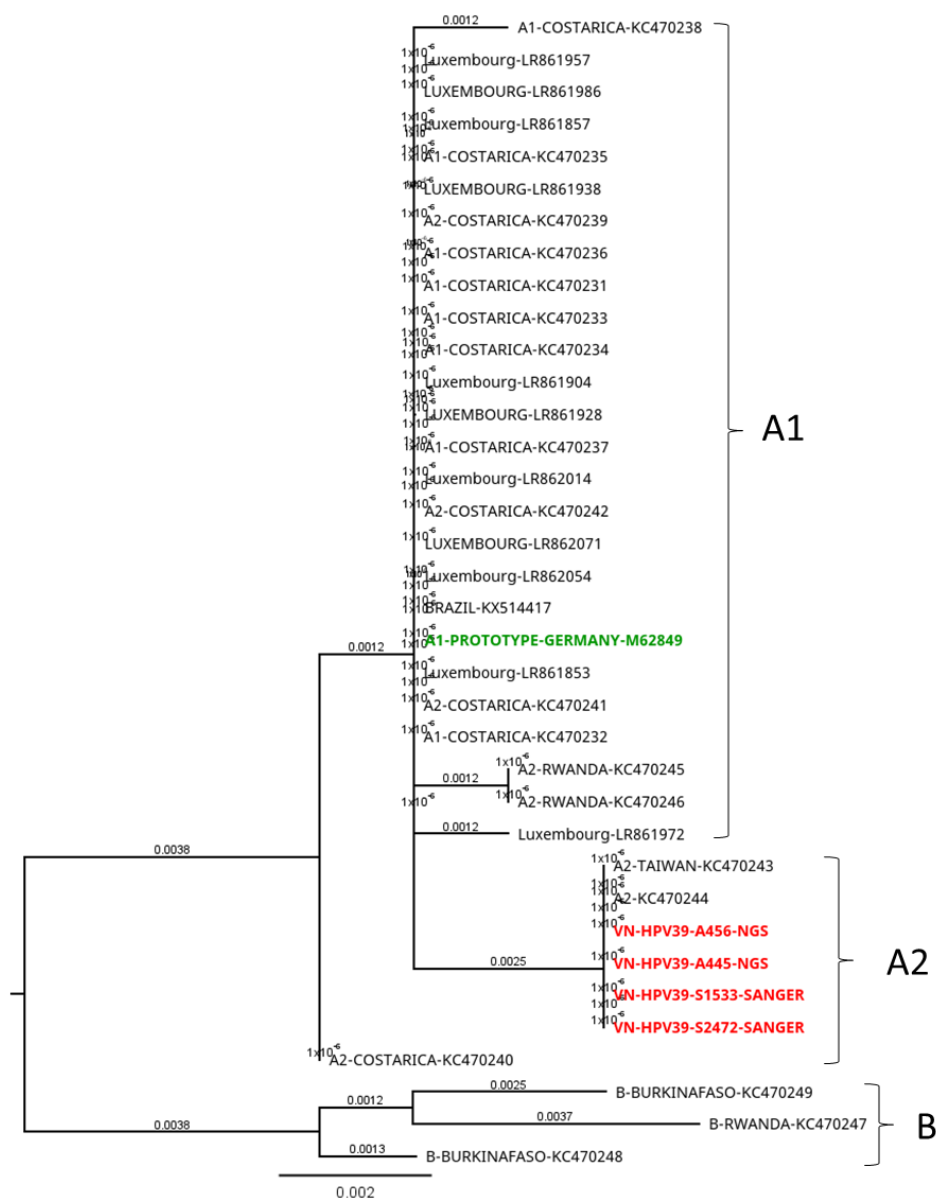
b. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV39

Gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 4 chủng HPV39. Dựa vào đoạn gen L1 và E6-E7, 4 chủng HPV39 trong nghiên cứu này được cùng phân loại thành dòng lớn A, dưới dòng A2, giống với các chủng từ Đài Loan (Hình 3.3 và Hình 3.4). Dựa vào trình tự gen L1 với độ dài 1518bp, dưới dòng A2, có 4-8 nucleotit (0,3-0,5%) khác biệt so với A1 và 12-15 nucleotit (0,8-1,0%) khác biệt so với dòng B. Các chủng thuộc cùng dòng A2 có 0-4 nucleotit khác biệt. Đa dạng trên gen E6-E7 lớn hơn đối với chủng HPV39, 0-3 nucleotit trong dưới dòng A2 hoặc giữa các dưới dòng A1 và A2, trong khi đó có 10-12 nucleotit khác biệt so với dòng B (1,2-1,5%) trên độ dài đoạn gen E6-E7 là 807bp.



Hình 3. 3 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV39

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype M62849 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

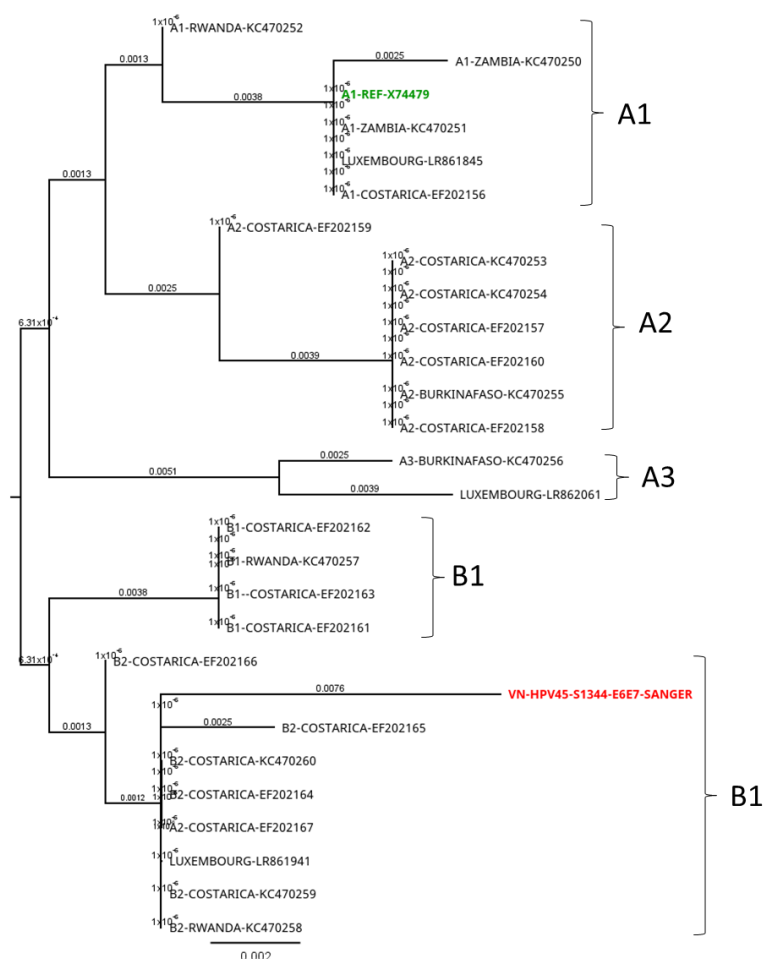


Hình 3. 4 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV39

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype M62849 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

c. Đặc điểm phân tử vùng gen E6-E7 của HPV45

Gen E6-E7 với độ dài 798bp được phân tích tương ứng trên 1 chủng HPV45. Dựa vào đoạn gen này, chủng HPV45 trong nghiên cứu này được cùng phân loại thành dòng B2 (hình 3.5), giống với chủng từ Costa Rica, có 12-17 nucleotit (1,5-2,1%) khác biệt so với A1, A2, A3 và B1, các chủng thuộc cùng dòng B2 có 7-9 (0,9-1,1%) nucleotit khác biệt. Có 10 vị trí thay đổi axit amin nằm trên 2 gen này.

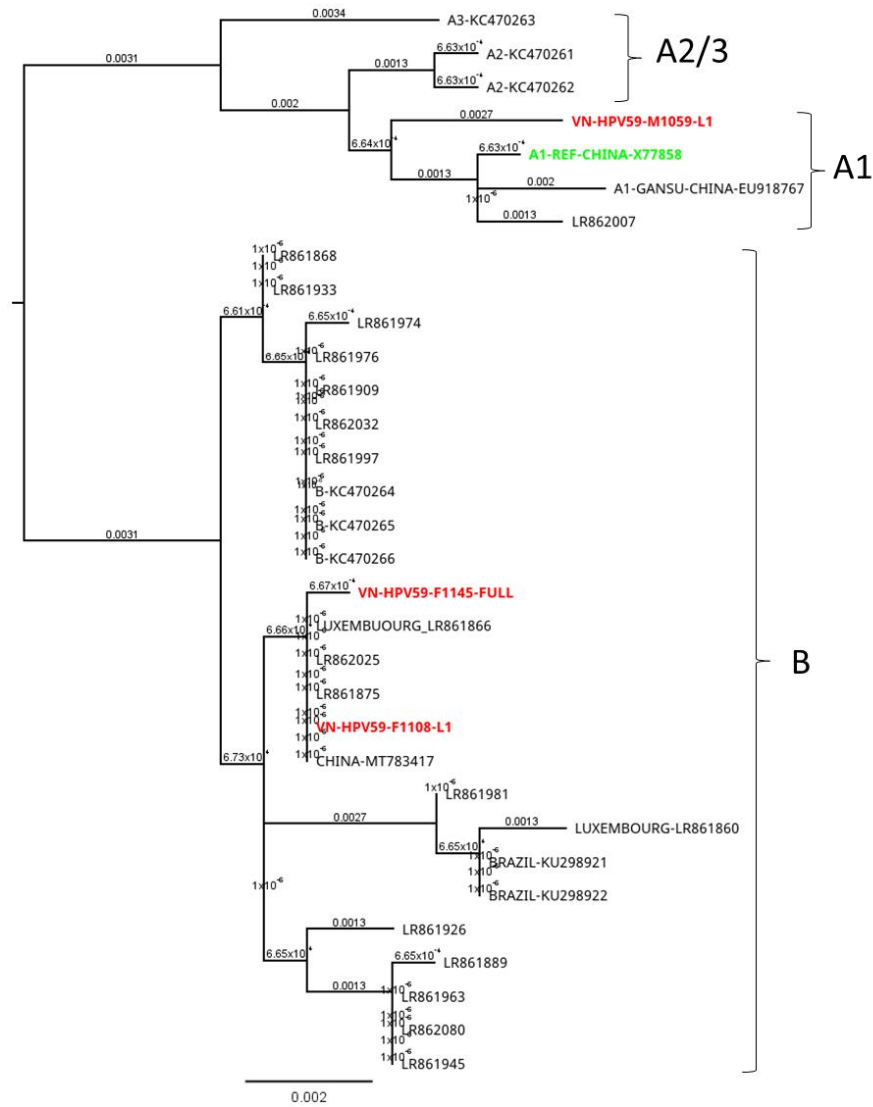


Hình 3. 5 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV45

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype X74479 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

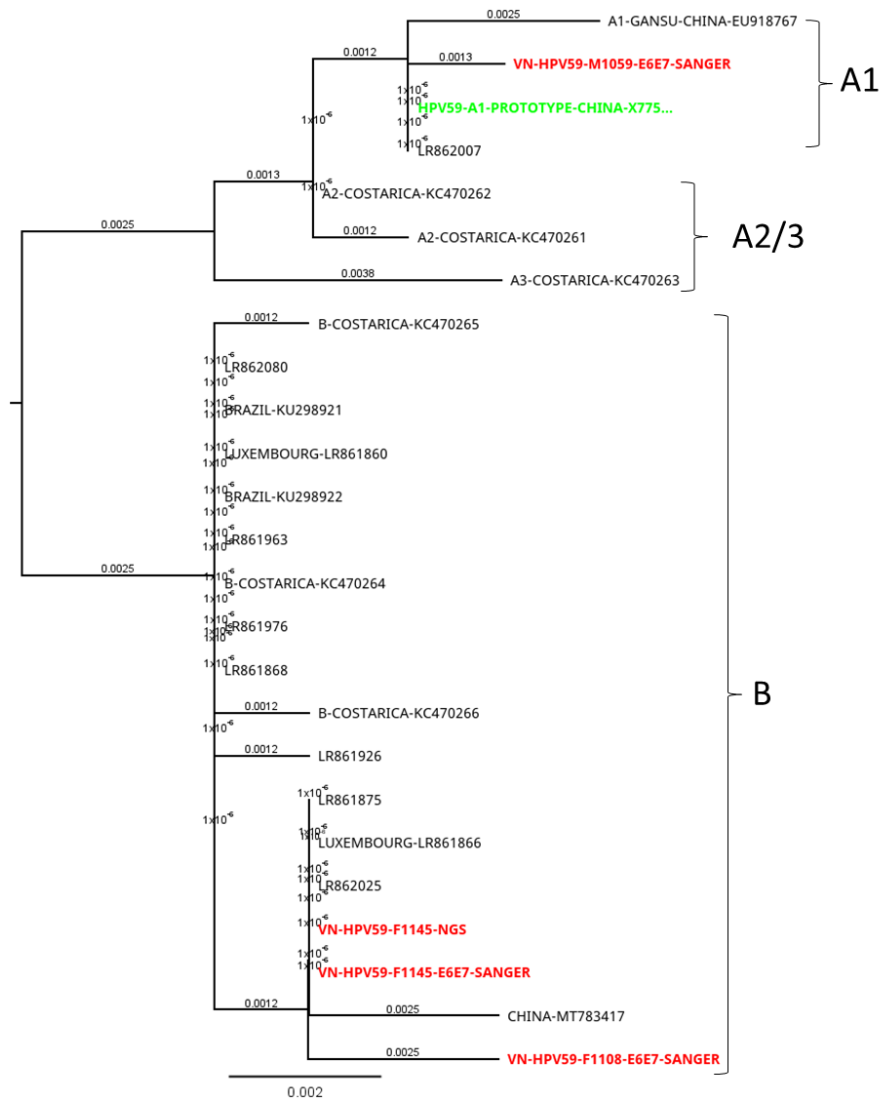
d. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV59

Trình tự gen L1 và E6-E7 được phân tích trên 3 chủng HPV59. Dựa vào đoạn gen E6-E7 và L1 các chủng HPV59 trong nghiên cứu này được cùng phân loại thành dưới dòng A1, và dòng B giống đa số các chủng từ Trung Quốc, Luxemburg (Hình 3.6 và Hình 3.7).



Hình 3. 6 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV59

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype X77858 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



Hình 3. 7 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV59

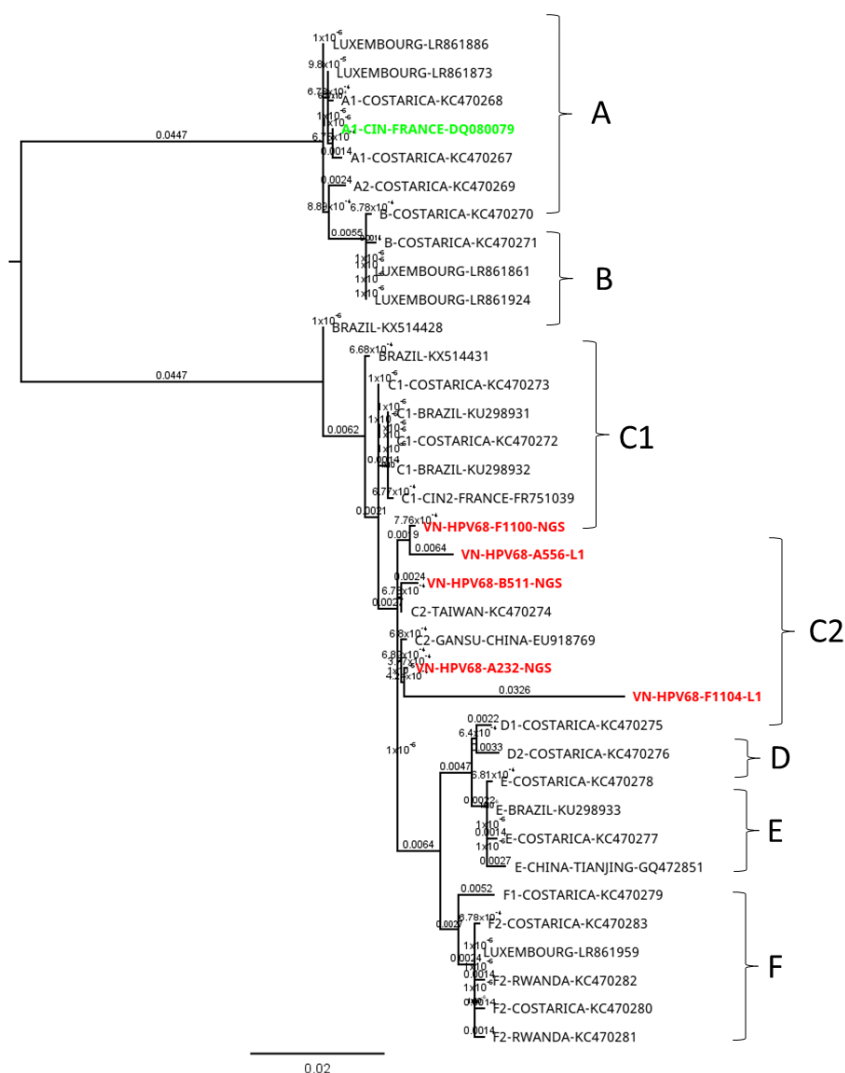
Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype X77858 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

Dựa vào đoạn gen L1 với độ dài 1527bp, 3 chủng HPV59 trong nghiên cứu này được phân có từ 18-22 (1,2%-1,4%) nucleotit khác biệt giữa dòng A và B; khác biệt giữa A1/A2/A3 ở mức 6-13 nu (0,4-0,9%), khác biệt giữa các chủng cùng thuộc dòng B ở mức 0-7 (0-0,5%) nucleotit trên gen L1.

Đa dạng di truyền trên gen E6-E7 cao hơn đa dạng trên L1 đối với chủng HPV59, 1-6 nucleotit (0,1-0,7%) trong dòng A, trong khi đó có 7-17 nucleotit (0,9-2,1%) khác biệt giữa dòng so với dòng B trên tổng độ dài E6-E7 là 807bp.

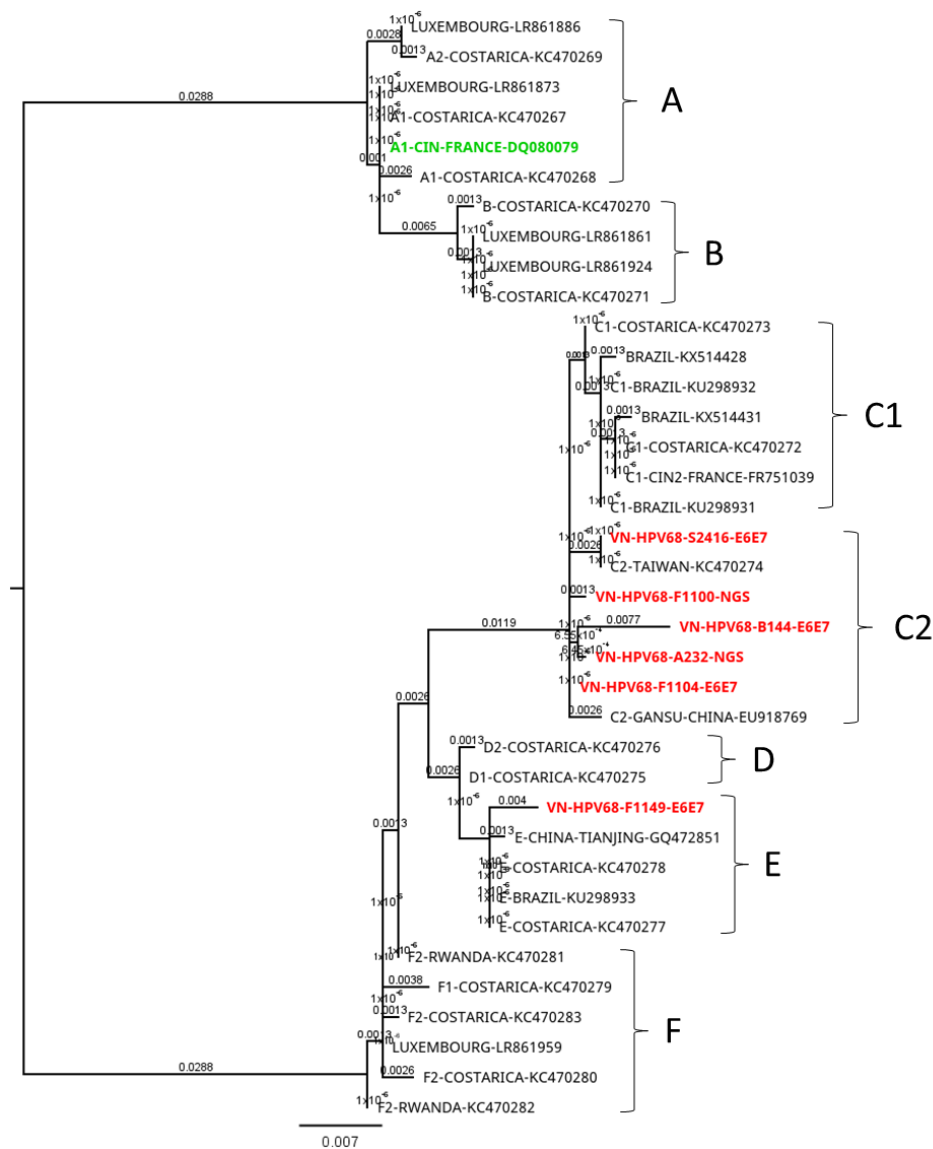
e. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV68

Trình tự gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 5 và 6 chủng HPV68 phân lập tại Việt Nam. Dựa vào đoạn gen L1 và E6-E7, phần lớn các chủng HPV68 trong nghiên cứu này được cùng phân loại thành dưới dòng C2, duy nhất 1 chủng thuộc dưới dòng E. Dưới dòng C2 có 19-90 nucleotit (1,3-5,9%) khác biệt so với dòng A, B, D, E và F (Hình 3.8 và Hình 3.9).



Hình 3. 8 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV68

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype DQ080079 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



Hình 3. 9 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV68

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype DQ080079 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

Dựa vào đoạn gen L1 với độ dài 1518bp, 3 chủng HPV68 trong nghiên cứu này được phân loại thành dưới dòng C2, giống với các chủng từ Đài Loan, Trung Quốc có từ 82-92 (5,4%-6,1%) nucleotit khác biệt giữa dòng C và A/B; khác biệt nhỏ hơn đáng kể giữa C và D/E/F ở mức 15-25 nucleotit (1,0-1,6%), khác biệt giữa các dưới dòng C2 ở mức 0-8 nucleotit trên gen L1.

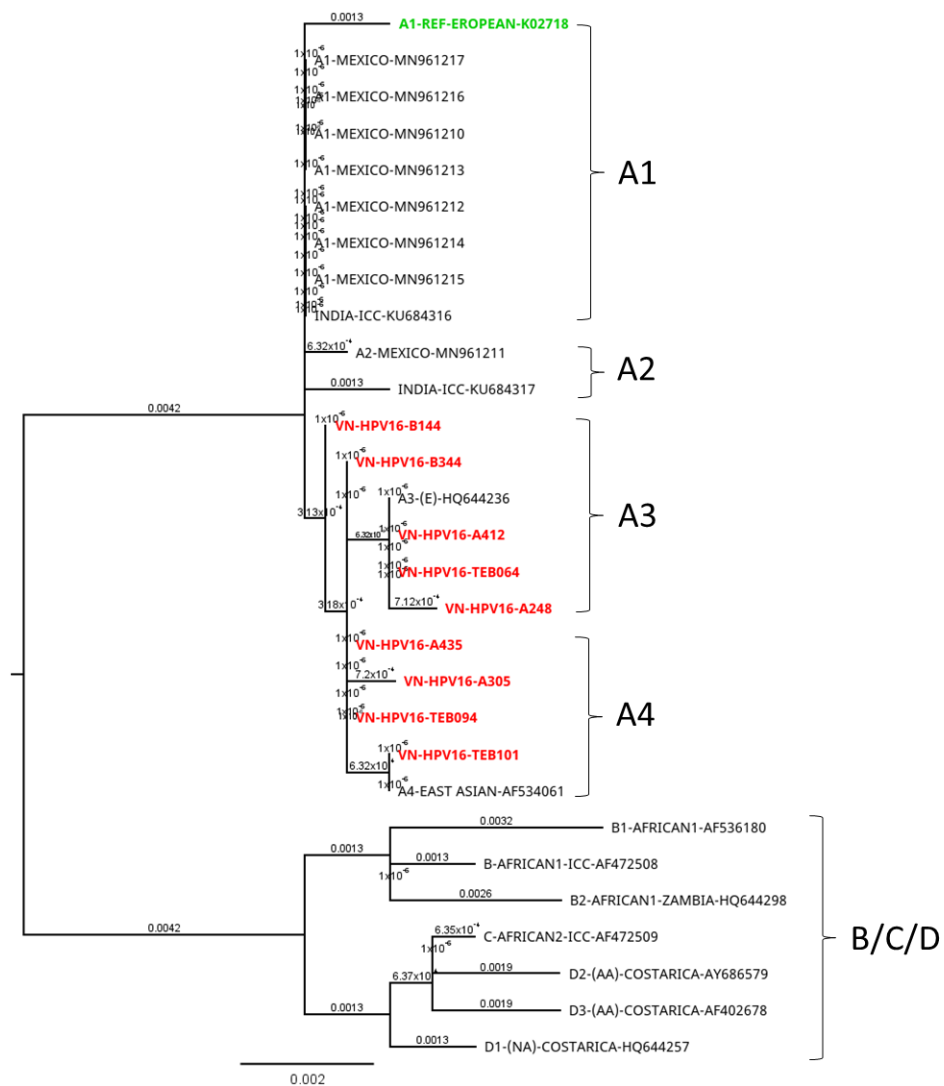
Đa dạng di truyền trên gen E6-E7 (độ dài 810bp) cao hơn đa dạng trên L1 đối với chủng HPV68: 1-10 nucleotit (0,12-1,22%) trong dòng C, trong khi đó có 43-50 nucleotit (5,26-6%) khác biệt giữa dòng so với dòng A/B. Khác biệt giữa C và các dòng D/E/F chỉ ở mức 11-18 nucleotit.

ii. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của các chủng HPV thuộc dưới chi alpha

9

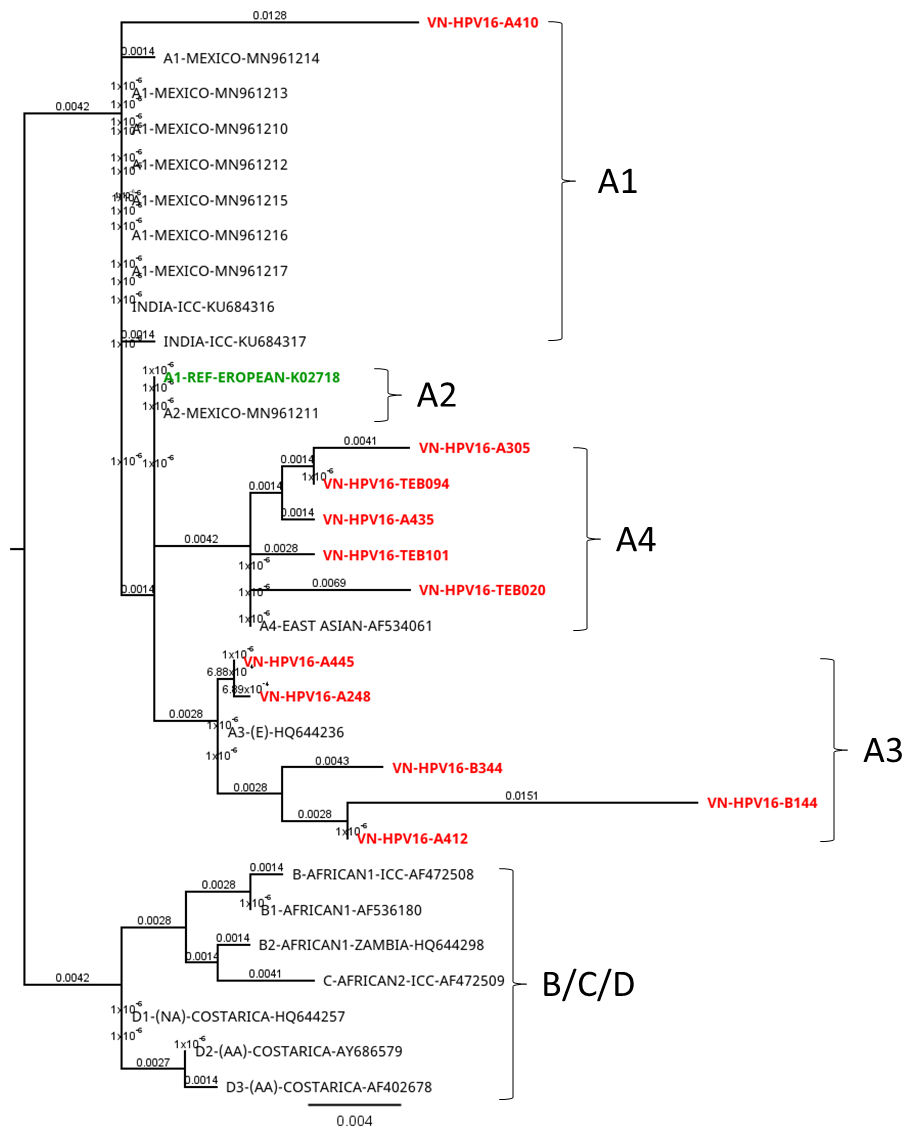
a. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV16

Gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 9 và 11 chủng HPV16. Dựa vào đoạn gen L1, các chủng HPV16 trong nghiên cứu được phân lập từ các mẫu dương tính trên đối tượng MSM, PNBD, nFSW và nữ sinh viên được phân loại thành dưới dòng A3 (European) và A4 (East Asian). Dựa vào trình tự gen L1 với độ dài 1596bp, các dưới dòng A chỉ biến đổi 0-3 nucleotit so với các chủng trong cùng dưới dòng, trong khi đó có 8-19 nucleotit (0,5-1,2%) khác biệt so với dòng B và D và 8-17 nucleotit khác biệt so với dòng C. Chỉ có 5 biến đổi về axit amin trên đoạn gen này (Hình 3.10).



Hình 3. 10 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV16

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype K02718 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



Hình 3. 11 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV16

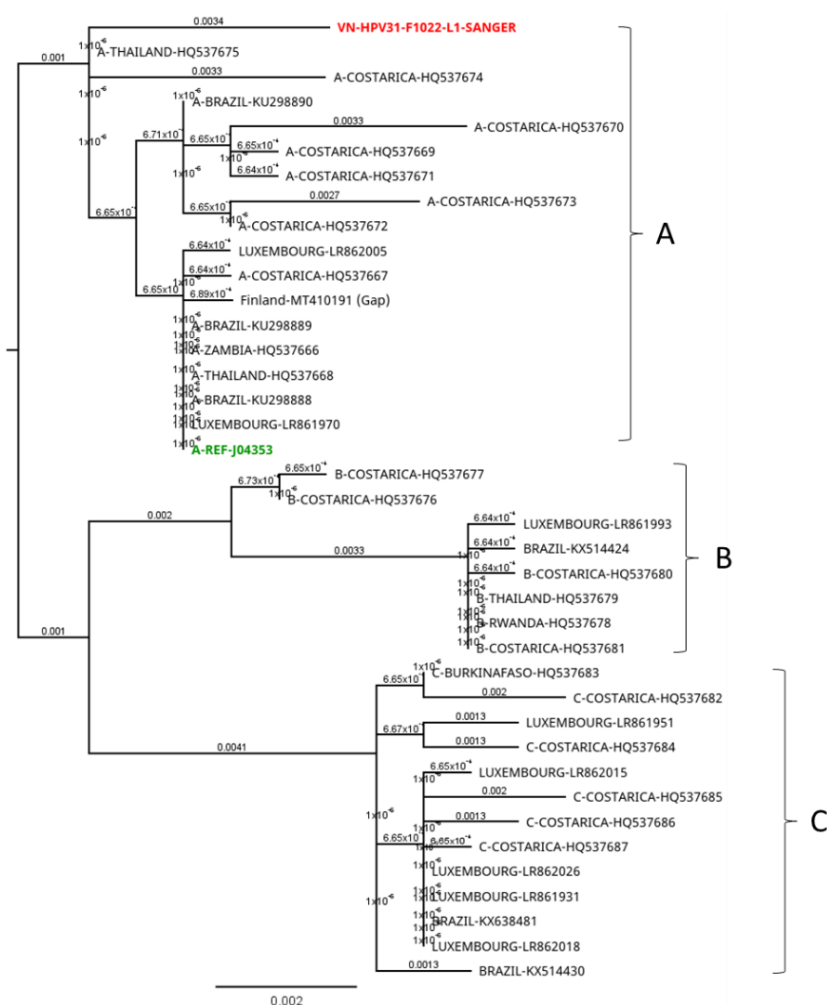
Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype K02718 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

Dựa vào trình tự gen E6-E7 với độ dài 774bp, 8 trong số 9 chủng có cùng phân loại dưới dòng với gen L1. Trên đoạn gen này, các dưới dòng A1 khác biệt 9-10 nucleotit (1,2-1,3%) với các A1 khác trên thế giới. Trong khi đó, dưới dòng A3 và A4 chỉ khác biệt 2-6 nucleotit trong cùng 1 dưới dòng. Dòng A khác biệt 14-20

nucleotit (1,8-2,6%) so với dòng B, C và D. Sự khác biệt về trình tự nucleotit dẫn đến 56 biến đổi về axit amin trên đoạn gen E6-E7 (Hình 3.11).

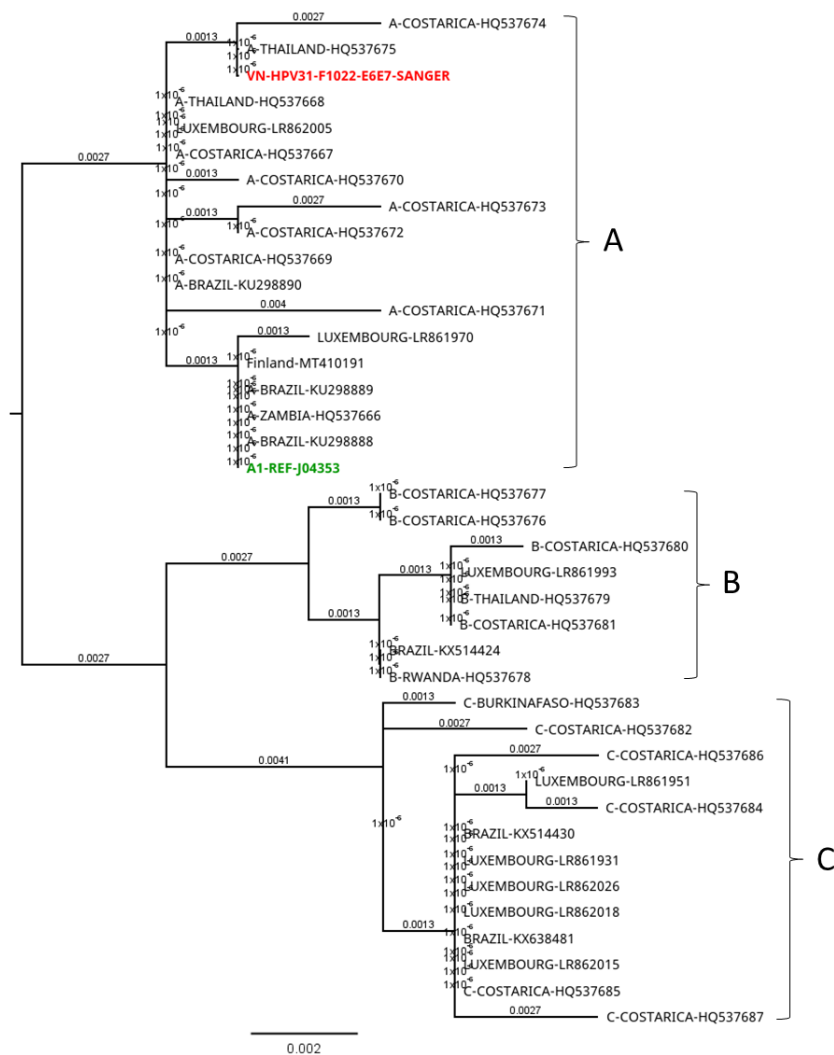
b. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV31

Gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 1 chủng HPV31. Dựa vào đoạn gen L1 (1515bp) chủng HPV31 trong nghiên cứu này được phân loại thành dòng A, có 13-19 nucleotit khác biệt so với dòng B và C (0,9-1,3%). Có 5 vị trí ghi nhận biến đổi axit amin trên đoạn gen này (Hình 3.12 và Hình 3.13).



Hình 3. 12 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV31

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype J04353 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



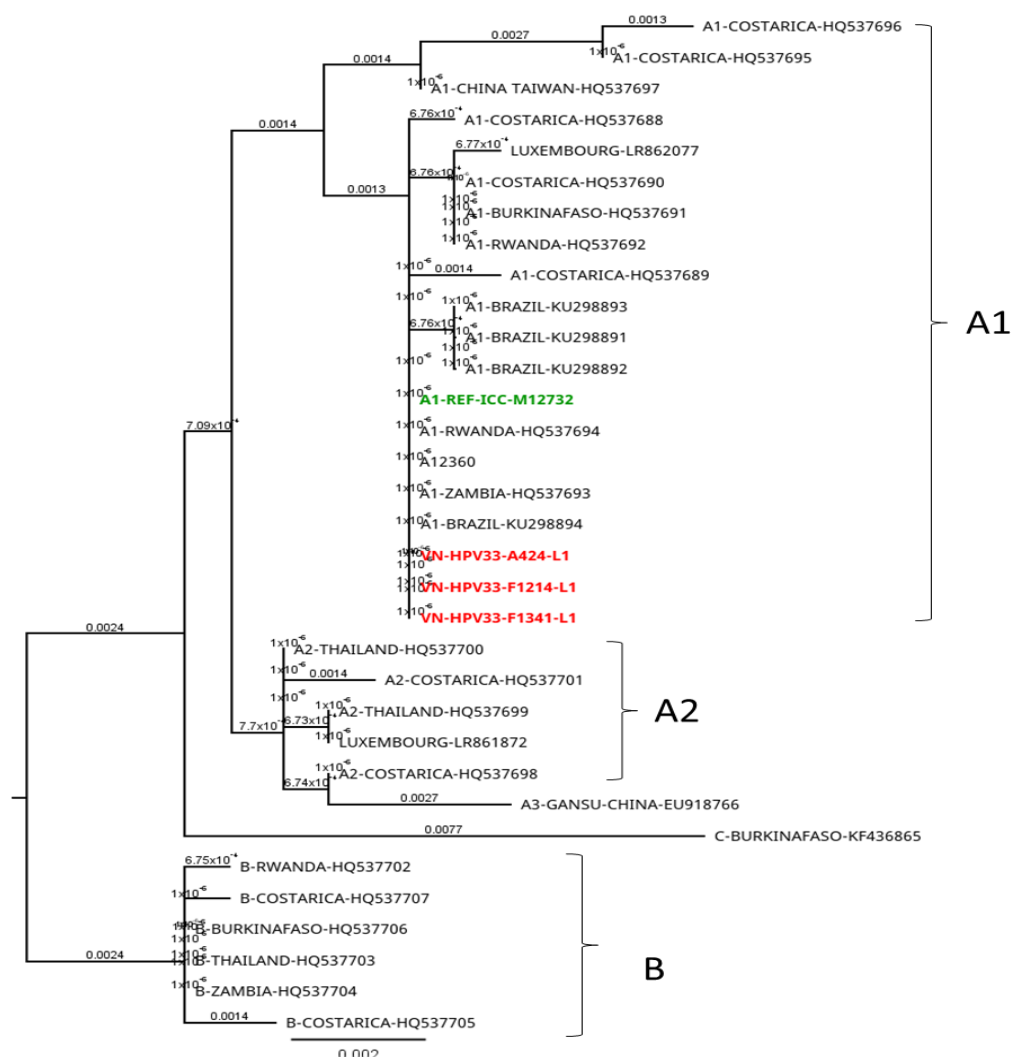
Hình 3. 13 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV31

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype J04353 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

Đối với đoạn gen E6-E7 (747bp), chủng của Việt Nam (dòng A) khác biệt 6-9 nucleotit (0,8-1,2%) so với B và 9-11 nucleotit (1,2-1,5%) so với C, Có 2 vị trí trên vùng E7 có biến đổi về axit amin.

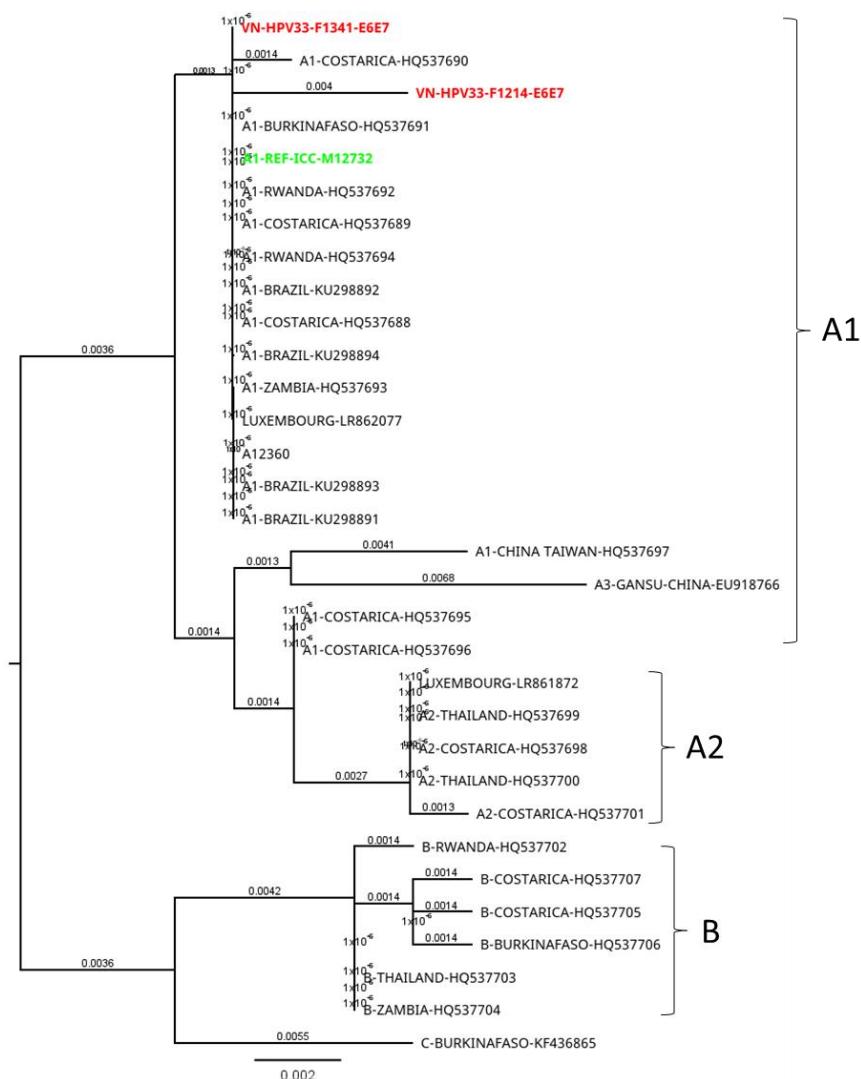
c. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV33

Gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 3 và 2 chủng HPV33. Cả 2 đoạn gen L1 và E6-E7 đều thống nhất phân loại dưới dòng A1 (giống với các chủng phân lập ở Braxin). Dựa vào gen L1 (1500bp), dưới dòng A1 có 5-7 nucleotit (0,3-0,5%) khác biệt so với A2, 10-12 nucleotit (0,7-0,8%) khác biệt so với B, 1,0% khác biệt so với C. Các chủng trong cùng một dòng A1 có 0-10 nucleotit khác biệt (Hình 3.14 và Hình 3.15).



Hình 3. 14 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV33

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype M12732 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



Hình 3. 15 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV33

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype M12732 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

Đoạn gen E6-E7 có tần suất biến đổi gen lớn hơn L1: 0-6 nucleotit trong cùng dòng A1, 3-8 nucleotit (0,4-1,1%) giữa A1 với A2/3, 8-14 nucleotit (1,1-1,9%) với dòng B và C trên độ dài gen E6-E7 744bp. Có 1 axit amin thay đổi trên đoạn gen E6-E7 của chủng A1 của Việt Nam so với chủng chuẩn, không có biến đổi axit amin nào xảy ra trên đoạn L1.

d. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV35

Gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 2 chủng HPV35. Dựa vào đoạn gen L1 và E6-E7, 2 chủng HPV35 trong nghiên cứu này được cùng phân loại thành dòng lớn A, dưới dòng A1, trong đó có các chủng từ Thái Lan, Rwanda, Hoa Kỳ, Braxin, Burkina Faso,... (Hình 3.16 và Hình 3.17).



Hình 3. 16 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV35

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype X74477 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



Hình 3. 17 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV35

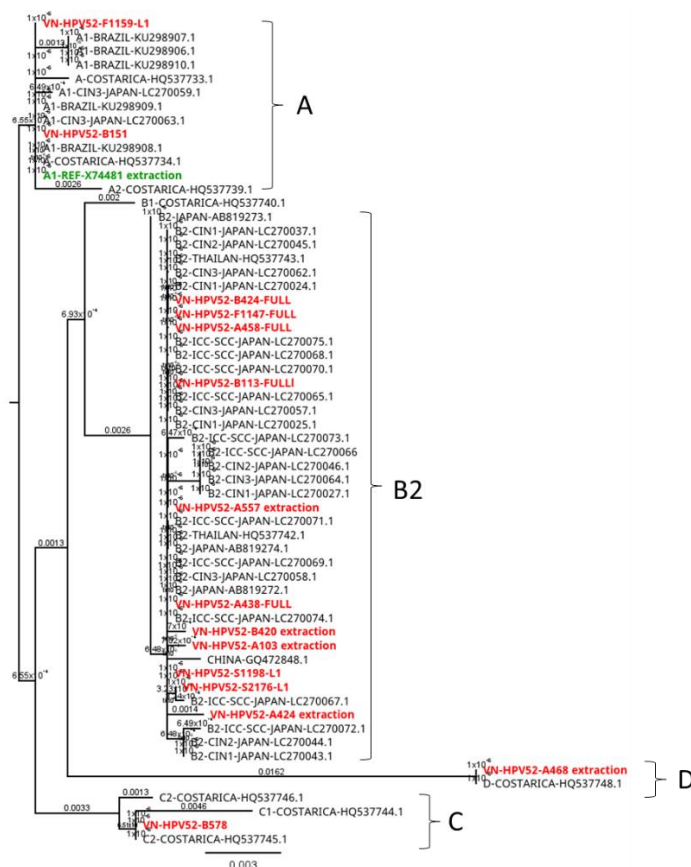
Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype X74477 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

Dựa vào gen L1 với độ dài 1509bp, dưới dòng A1, có 7-10 nucleotit (0,5-0,7%) khác biệt so với A2 và B. Các chủng thuộc cùng dòng A có 3-8 nucleotit (0,2%-0,5%) khác biệt. Dựa vào E6-E7 với độ dài 750bp, dưới dòng A1, có 3-7 nucleotit (0,4-0,9%) khác biệt so với A2 và B. Các chủng thuộc cùng dòng A có 0-6 nucleotit (0-0,8%) khác biệt. Chỉ có 1 vị trí trên gen E có biến đổi về axit amin, trong khi đó đoạn gen L1 có 11 vị trí biến đổi về axit amin. Đáng chú ý là vị trí biến đổi T1042A

(S348T) làm tăng nguy cơ ung thư khi so sánh tỷ lệ biến đổi này trong nhóm tiền ung thư và nhóm bình thường, OR (95% CI)=1,37 (0,4-5,2).

e. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV52

Trình tự gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 15 và 19 chủng HPV52. Dựa vào đoạn gen L1 và E6-E7, các chủng HPV52 trong nghiên cứu này chủ yếu nằm trong dưới dòng B2 (15/19 chủng), còn lại thuộc dòng/dưới dòng A1, B2, C2 và D. Dưới dòng B2 phổ biến hơn cả ở các nước châu Á, đây cũng là dưới dòng liên quan nhiều nhất tới ung thư ở Nhật Bản. Trừ một số chủng không giải được trình tự L1, phân loại dựa trên E6-E7 có kết quả tương đương (Hình 3.18 và Hình 3.19).



Hình 3. 18 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV52

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype X74481 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



Hình 3. 19 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV52

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype X74481 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

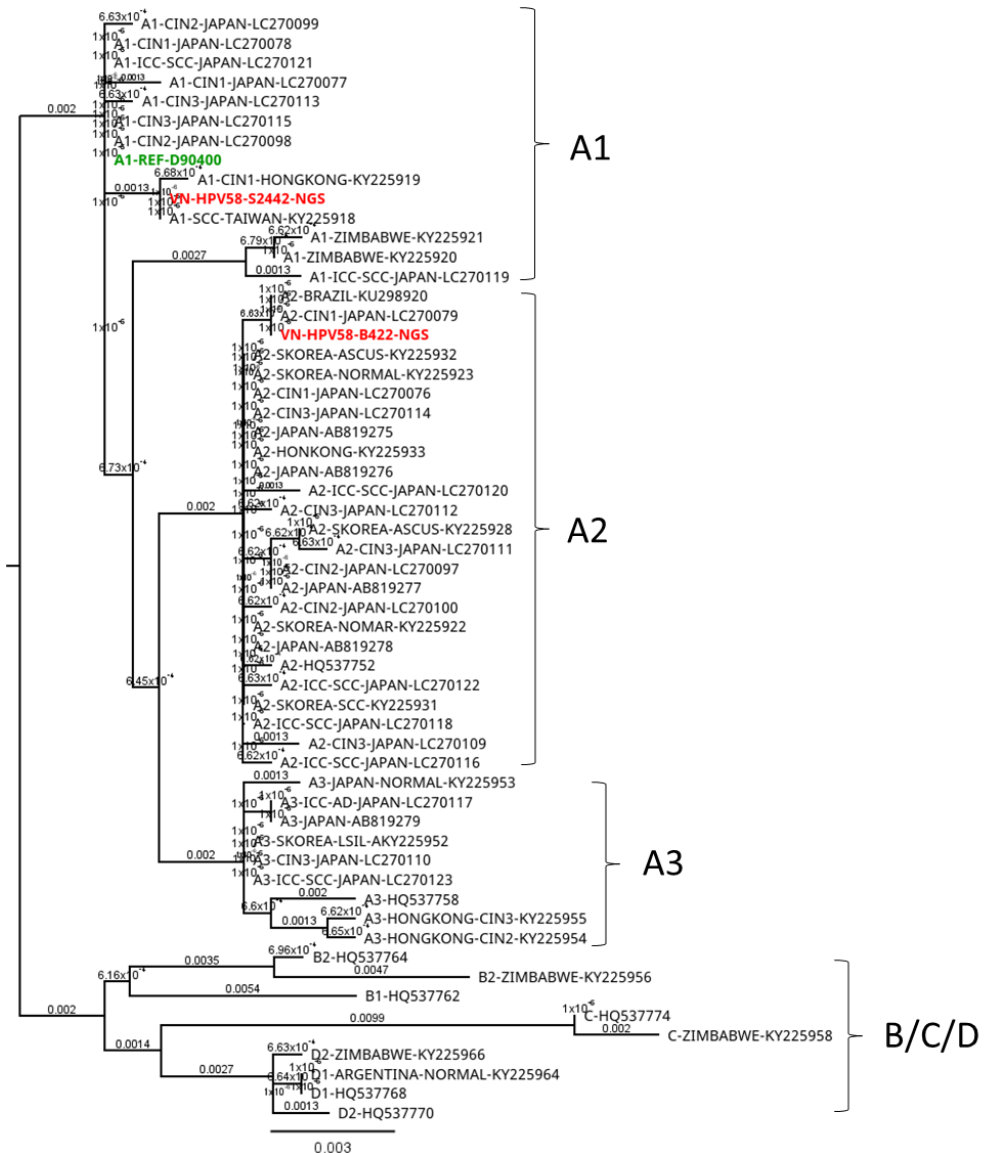
Dựa vào đoạn gen L1 và E6-E7, 15 chủng HPV52 trong nghiên cứu này được cùng phân loại thành dưới dòng B2, gần gũi với các chủng nguồn gốc từ Nhật Bản, Thái Lan, Trung Quốc, có từ 0-10 (0,13%) nucleotit khác biệt trong cùng dưới dòng B2; số nucleotit khác biệt với A1 lên đến 75-92 nucleotit (0,94-1,15%), khác biệt 69-

123 nucleotit (0,86-1,54%) so với các dòng C, D trên độ dài đoạn L1 và E6-E7 tương ứng là 1590bp và 747bp.

Đa dạng trên gen E6-E7 tương đương đa dạng trên L1 đối với chủng HPV51, 0-6 nucleotit (0-0,78%) trong dòng A hoặc giữa các dưới dòng A1 và A2; trong khi đó có 4-8 nucleotit (0,52-1,04%) khác biệt so với dòng B.

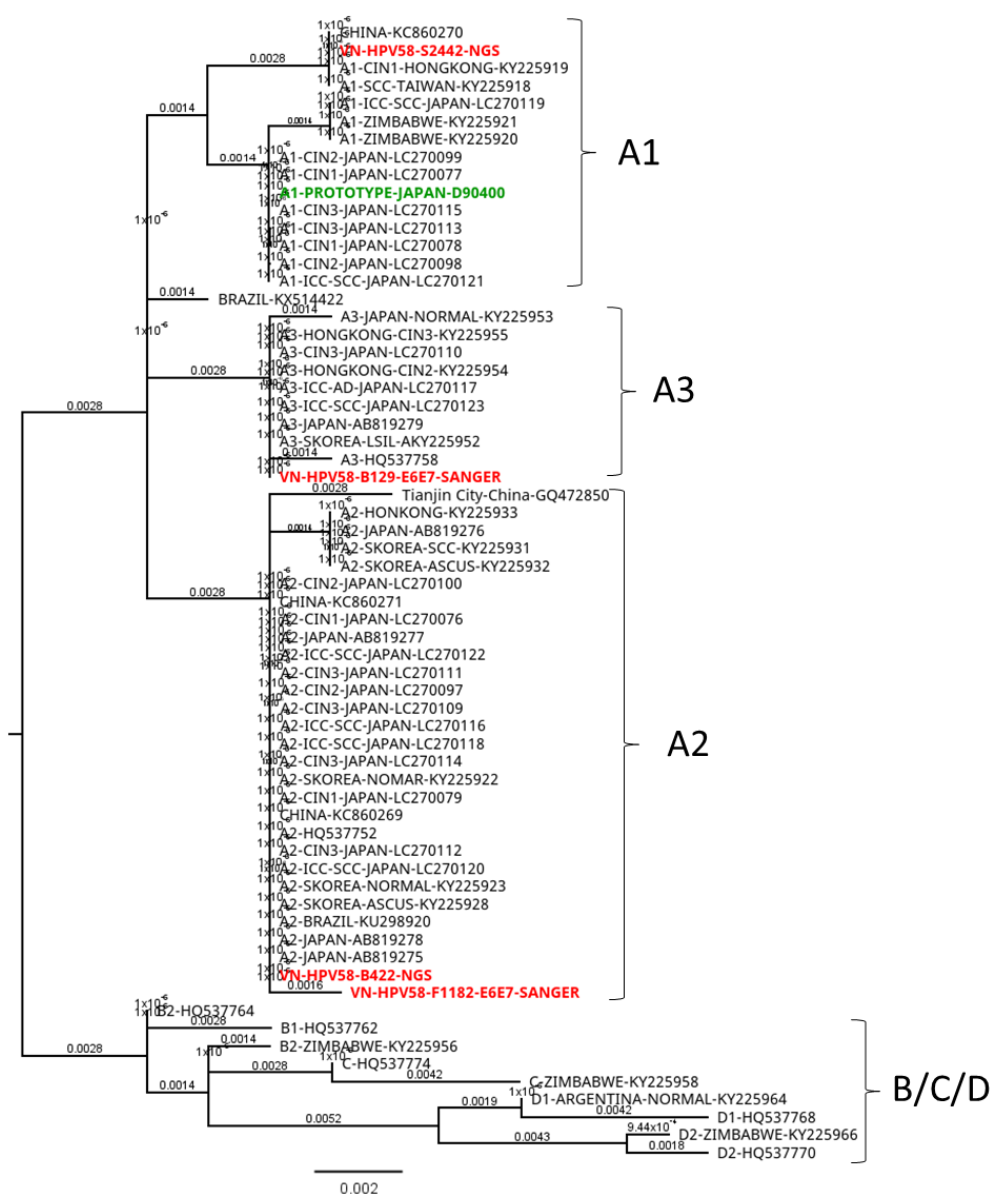
f. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV58

Trình tự gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 2 và 4 chủng HPV58. Dựa vào đoạn gen L1 và E6-E7, các chủng HPV58 trong nghiên cứu này được cùng phân loại thành dưới dòng A1, A2 và A3 cùng với các chủng từ Trung Quốc, Costa Rica trong khi đó dòng B1 và B2 tìm thấy nhiều ở Braxin, Luxembourg. Với số lượng chủng không cao, phân loại dựa trên L1 và E6-E7 có kết quả tương đương. Phân loại dựa trên toàn bộ hệ gen của 7 chủng cũng tương đương với kết quả phân loại dựa trên L1 và E6-E7 (Hình 3.20 và Hình 3.21).



Hình 3. 20 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV58

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype D09004 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



Hình 3. 21 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV58

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype D90400 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

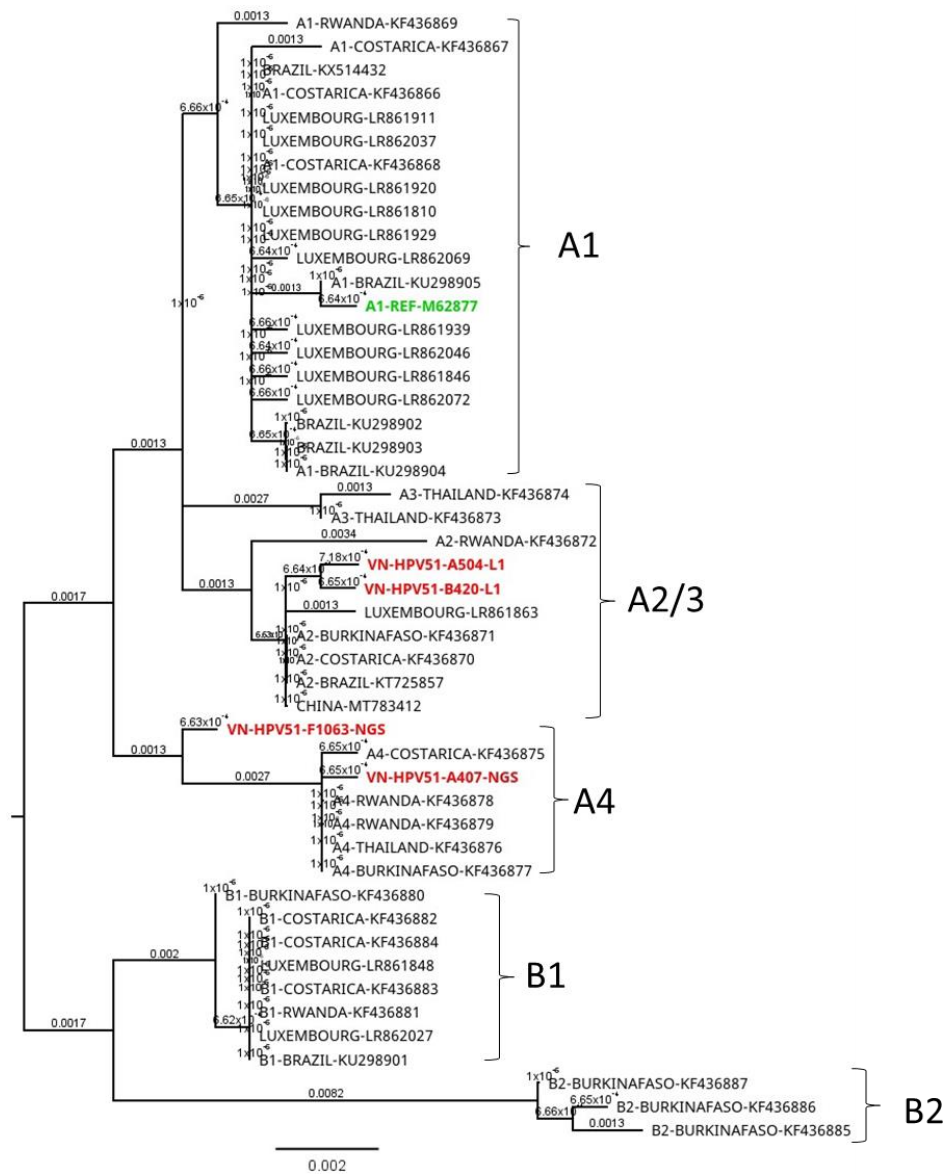
Dựa vào đoạn gen L1 (độ dài 1575bp), 2 chủng HPV58 trong nghiên cứu này được cùng phân loại thành dưới dòng A1 và A2, giống với các chủng từ Đài Loan và Nhật Bản, có từ 13-29 (0,8%-1,8%) nucleotit khác biệt so với dòng B/C/D; khác biệt giữa A1/A2 ở mức 5-10 nucleotit (0,3-0,6%) trên gen L1.

Đa dạng trên gen E6-E7 (độ dài 747bp) tương đương đa dạng trên L1 đối với chủng HPV58, 0-6 nucleotit (0-0,8%) trong dòng A, trong khi đó có 6-9 nucleotit (0,8-1,2%) khác biệt so với dòng B, 8-14 nucleotit (1,1-1,8%) khác biệt so với dòng C và D.

iii. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của các chủng HPV thuộc dưới chi alpha khác

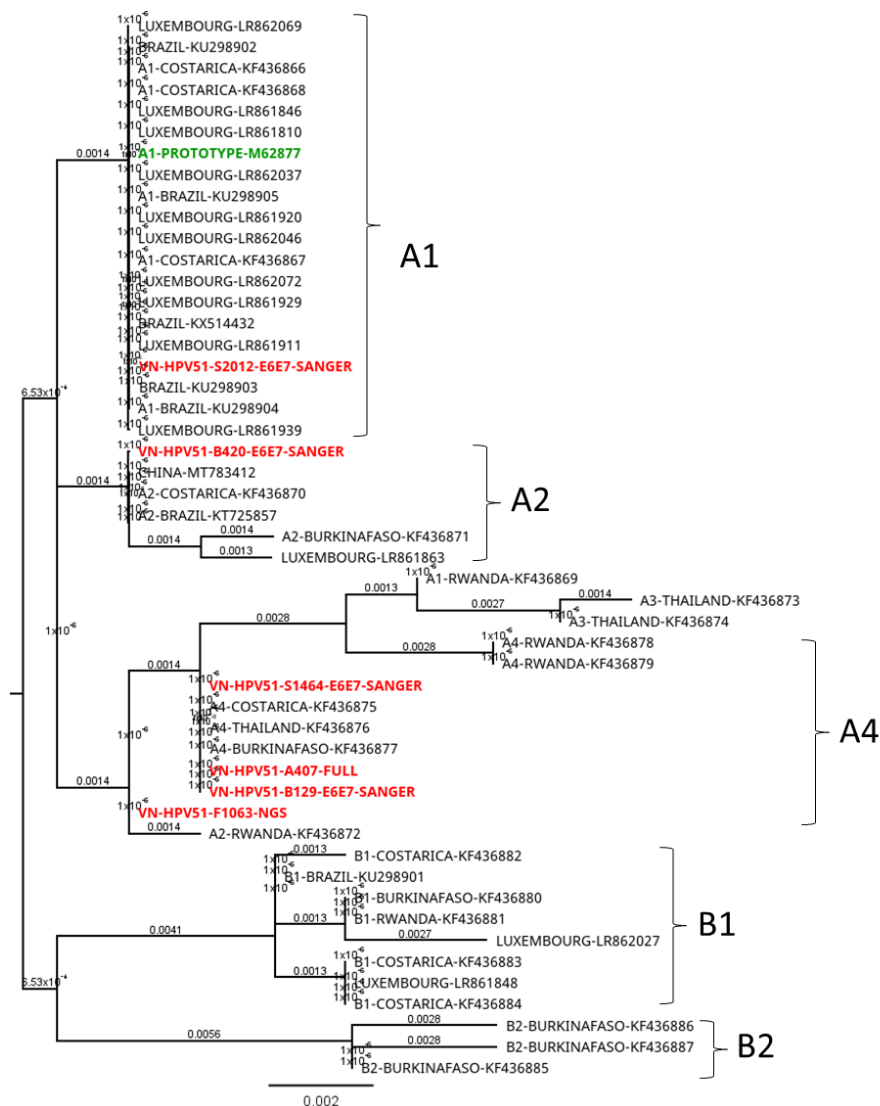
a. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV51

Trình tự gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 4 và 6 chủng HPV51. Dựa vào đoạn gen L1 và E6-E7, 6 chủng HPV51 trong nghiên cứu này được cùng phân loại thành dưới dòng A1, A2 và A4, trong đó có các chủng từ Rwanda, Hoa Kỳ, Braxin, Burkina Faso,... Ngoài một số chủng không giải được trình tự L1, phân loại dựa trên E6-E7 có kết quả tương đương (Hình 3.22 và Hình 3.23).



Hình 3. 22 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV51

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype M62877 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



Hình 3. 23 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV51

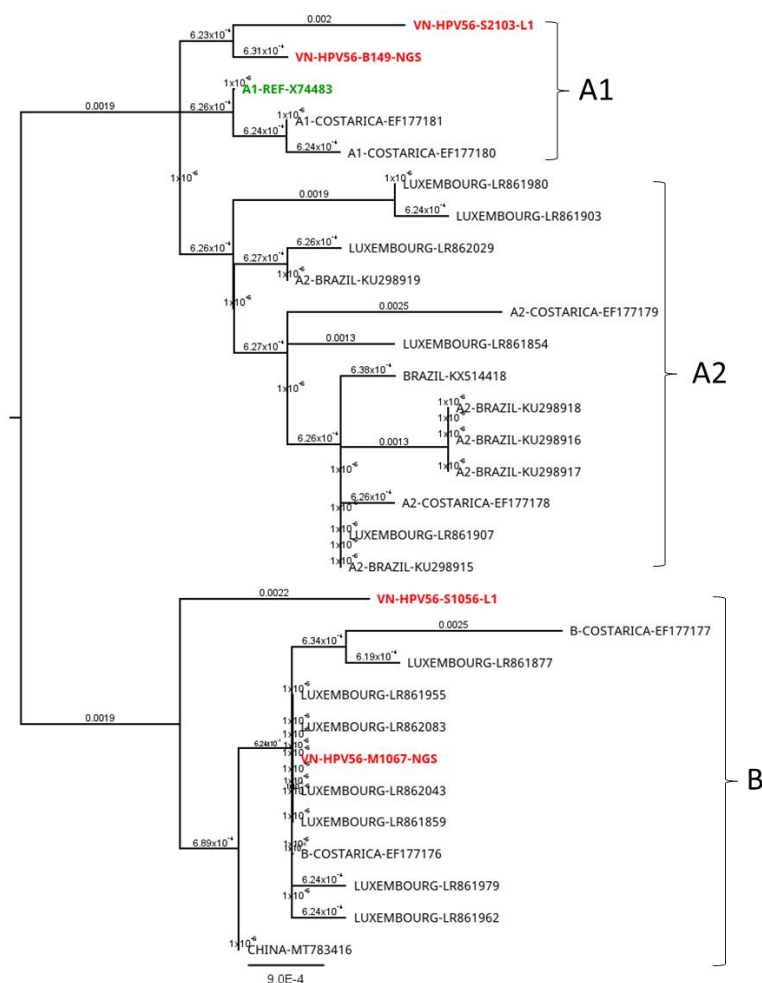
Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype M62877 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

Trên độ dài 1515bp của đoạn L1, dưới dòng A2 có 11-16 nucleotit (0,73-1,06%) khác biệt so với B1 và 6-16 nucleotide (0,4-1,06%) khác biệt trong dòng A. Trong khi đó, các chủng thuộc cùng dưới dòng A2 có 2-9 nucleotit khác biệt.

Đa dạng trên gen E6-E7 (762bp) tương đương đa dạng trên L1 đối với chủng HPV51, 0-6 nucleotit (0-0,8%) trong dòng A hoặc giữa các dưới dòng A1 và A2; trong khi đó có 4-8 nucleotit (0,5-1,0%) khác biệt so với dòng B.

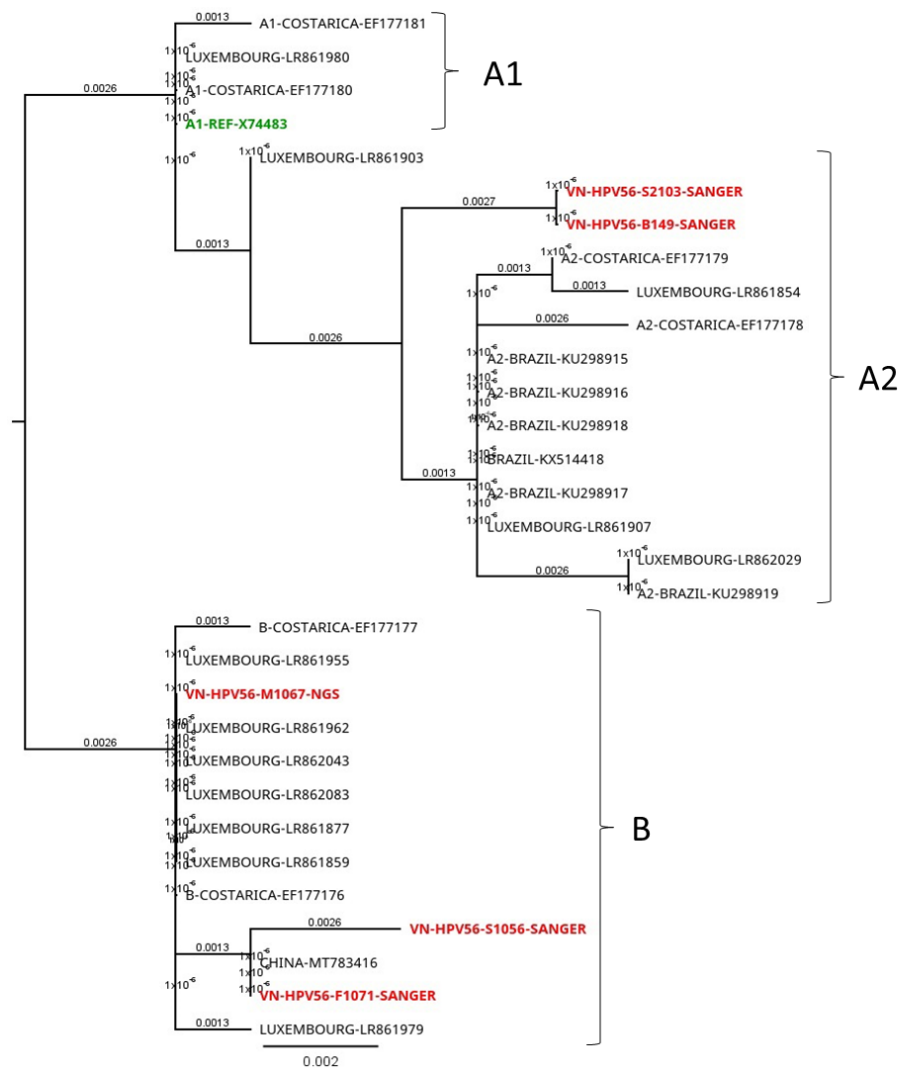
b. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV56

Trình tự gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 4 và 5 chủng HPV56. Dựa vào đoạn gen L1, các chủng HPV56 trong nghiên cứu này được phân loại thành dưới dòng A1 (giống chủng từ Costa Rica) và dòng B (giống chủng từ Costa Rica và Luxembourg), trong đó nếu dựa vào E6-E7 các chủng này được chia thành dưới dòng A2 (giống chủng từ Luxembourg) và B (giống chủng từ Luxembourg và Trung Quốc),... (Hình 3.24 và Hình 3.25).



Hình 3. 24 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV56

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype X74483 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ ở của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



Hình 3. 25 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV56

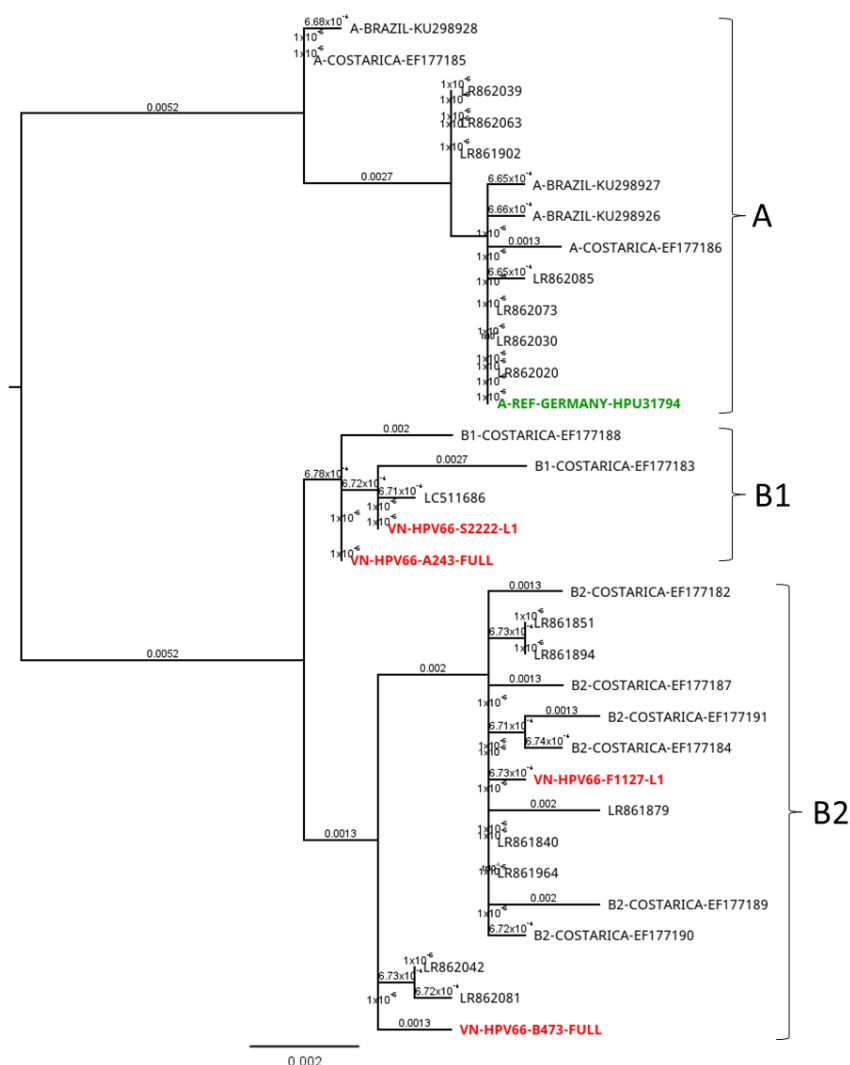
Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype X74483 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ ở hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

Dựa vào đoạn gen L1 (1605bp), có 2 chủng HPV56 trong nghiên cứu này được phân loại thành dòng B, có từ 0-7 (0-0,4%) nucleotit khác biệt trong dòng B; khác biệt với A1/A2 ở mức 11-16 nu (0,68-0,99%).

Đa dạng trên gen E6-E7 (786bp) tương đương đa dạng trên L1 đối với chủng HPV56, 3-7 nucleotit (0,4-0,9%) trong dòng A hoặc giữa các dòng B (0-4 nucleotit khác biệt); trong khi đó có 9-11 nucleotit (1,1-1,4%) khác biệt so với dòng B.

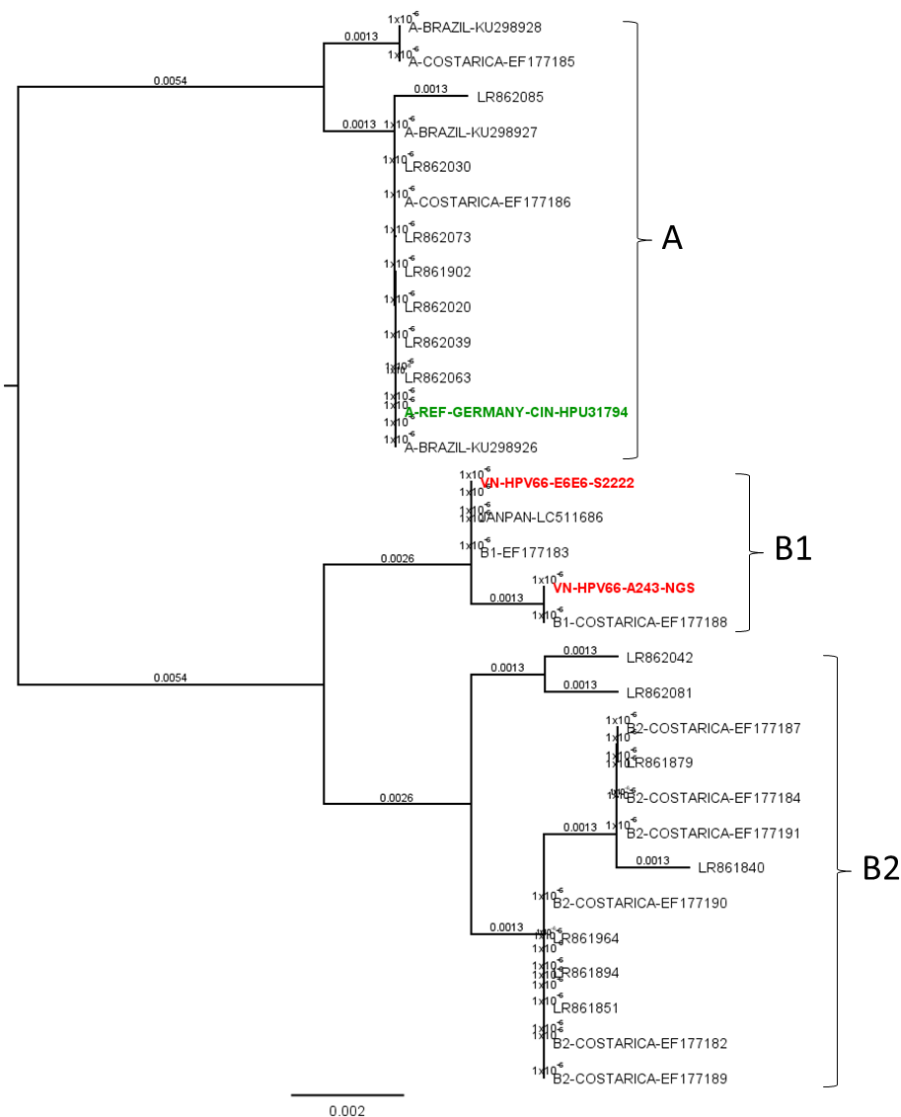
c. Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6-E7 của HPV66

Trình tự gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 4 và 2 chủng HPV66. Dựa vào đoạn gen L1 và E6-E7, các chủng HPV66 trong nghiên cứu này được cùng phân loại thành dưới dòng B1 và B2 trong đó có các chủng Nhật Bản, Luxemburg, Costa Rica,... Trong khi đó các chủng có nguồn gốc từ Braxin và nhiều chủng Luxemburg khác thuộc dòng A (Hình 3.26 và Hình 3.27).



Hình 3. 26 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen L1 của HPV66

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype HPU31794 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.



Hình 3. 27 Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen E6-E7 của HPV66

Các chủng phân lập ở Việt Nam được in đậm tô màu đỏ, chủng prototype HPU31794 được in đậm tô màu xanh. Thanh tỷ lệ của hình biểu thị tỷ lệ nucleotit khác biệt giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tham chiếu.

Dựa vào đoạn gen L1 với độ dài 1512bp, 4 chủng HPV66 trong nghiên cứu này có từ 25-40 (1,7%-2,6%) nucleotit khác biệt giữa dòng A và B; khác biệt giữa B1/B2 ở mức 1-10 nu (0,07-0,7%).

Đa dạng di truyền trên 786bp của gen E6-E7 đối với chủng HPV66 thấp, 1-8 nucleotit (0,13-1,02%) trong dòng B, trong khi đó có 11-21 nucleotit (1,4-2,7%) khác biệt giữa dòng A so với dòng B.

iv. Đa dạng di truyền của các chủng HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018

Bảng 3.7 cho thấy đặc điểm dịch tễ học phân tử chung của các týp HPV lưu hành tại Việt Nam. Trong đó, các týp ít phân nhánh là HPV18 (chủ yếu lưu hành dòng A1, có quan hệ gần gũi với nguồn từ Nhật Bản, Thái Lan), 39 (A2 – Đài Loan), 68 (C2 – Đài Loan, Trung Quốc), 52 (B2 – Nhật Bản, Thái Lan, Trung Quốc). Các týp này chủ yếu thuộc loài alpha 7 và có nguồn gốc Đông Á. Các týp phân nhánh nhiều bao gồm HPV16, 58, 51, 56, 66, Các týp này chủ yếu thuộc loài alpha 9 và các chủng thuộc alpha khác có kiểu gen giống với chủng ở nhiều nơi trên thế giới, bao gồm các quốc gia thuộc châu Á, Mỹ la tinh. Kết quả về đa dạng di truyền xem phụ lục 1

Bảng 3. 7 Đa dạng di truyền vùng gen L1, E6-E7 của các chủng HPV

Dưới chi	Týp	Dòng/ Dưới dòng (n)	Nguồn tương đồng	Dòng/ Dưới dòng (n)	Nguồn tương đồng
		L1		E6-E7	
Alpha 7	HPV 18	A1 (4)	Nhật Bản, Thái Lan, Costa Rica	A1 (9)	Costa Rica
	HPV 39	A2 (3)	Đài Loan	A2 (4)	Đài Loan
	HPV 59	A1 (1)	Trung Quốc	A1 (1)	Trung Quốc
		B (2)	Trung Quốc, Luxembourg	B (2)	Trung Quốc, Luxembourg
	HPV 68	C2 (5)	Đài Loan, Trung Quốc	C2 (5)	Đài Loan
				E (1)	Trung Quốc, Costa Rica, Braxin
HPV45			B2 (1)	Costa Rica	
Alpha 9	HPV 16	A3 (4)	Châu Âu	A1 (1)	Châu Âu
		A4 (4)	Đông Á	A3 (5)	Châu Âu
		A1 (1)	Châu Âu	A4 (5)	Đông Á
	HPV 31	A (1)	Thái Lan	A (1)	Thái Lan
	HPV 33	A1 (3)	Braxin	A1 (2)	Costa Rica

Dưới chi	Týp	Dòng/ Dưới dòng (n)	Nguồn tương đồng	Dòng/ Dưới dòng (n)	Nguồn tương đồng	
		L1		E6-E7		
	HPV 35	A1 (2)	Rwanda, Hoa Kỳ	A1 (2)	Thái Lan, Rwanda, Brukinna Faso	
	HPV 52	A1 (2)	Braxin, Nhật Bản	A1 (2)	Braxin, Nhật Bản	
		B2 (11)	Nhật Bản, Thái Lan, Trung Quốc	B2 (16)	Nhật Bản, Thái Lan, Trung Quốc, Costa Rica	
		C2 (1)	Costa Rica			
		D (1)	Costa Rica	D (1)	Costa Rica	
	HPV 58	A1 (1)	Đài Loan	A1 (1)	Hồng Kông, Trung Quốc	
		A2 (1)	Nhật Bản	A2 (2)	Nhật Bản, Trung Quốc, Hồng Kông	
				A3 (1)	Costa Rica	
	Alpha khác	HPV 51	A2 (2)	Luxembourg	A1 (1)	Braxin
			A4 (2)	Thái Lan, Rwanda, Brukina Faso	A2 (1)	Trung Quốc
				A4 (3)	Costa Rica, Thái Lan, Burkina Faso	
				A (1)	Costa Rica	
HPV 56		A1 (2)	Costa Rica	A2 (2)	Luxembourg, Braxin, Costa Rica	
		B (2)	Luxembourg, Costa Rica	B (3)	Luxembourg, Trung Quốc,	
HPV 66		B1 (2)	Costa Rica, Nhật Bản	B1 (2)	Nhật Bản, Costa Rica	
		B2 (2)	Luxembourg, Costa Rica			

3.2 Phát triển bộ mẫu chuẩn nhằm đánh giá sinh phẩm chẩn đoán Realtime-PCR cho 14 týp HPV nguy cơ cao

Bảng 3.8 cho thấy kết quả xây dựng Bộ mẫu chuẩn được phát triển trong quy mô phòng thí nghiệm nhằm đánh giá sinh phẩm chẩn đoán Realtime-PCR cho 14 týp HPV nguy cơ cao gồm có 5 panel mẫu chuẩn thành viên để đánh giá các chỉ số về độ nhạy phân tích, độ đặc hiệu phân tích, độ nhạy lâm sàng, độ đặc hiệu lâm sàng và độ chính xác.

Bộ mẫu chuẩn được tạo ra từ việc nhân dòng thành công 14 mẫu plasmid tái tổ hợp tương ứng với 14 týp HPV nguy cơ cao bằng quy trình nhân dòng tạo plasmid chứa đoạn gen đích E6-E7. Nồng độ ADN HPV trong các mẫu thành viên được xác định bằng Digital PCR (Biorad, Hoa kỳ).

Ngoài ra nhóm nghiên cứu sử dụng các mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính và âm tính đã được sàng lọc bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu PGMY09/PGMY11 và định týp bằng 2 bộ sinh phẩm HPV Genotypes 14 Real™ Quant (Sacace, Ý) và Genoflow™ HPV array test kit (Diagcor, Hong Kong) để xác định đặc tính týp HPV của mẫu.

Bộ mẫu chuẩn chứa 5 panel mẫu chuẩn thành viên được thiết lập và tạo ra bao gồm 20 ống/mẫu/panel mẫu chuẩn thành viên (200µl/ống). Các mẫu chuẩn thành viên trong bộ panel mẫu chuẩn đều được thiết lập các đặc tính kỹ thuật bằng các quy trình kỹ thuật đã được đưa ra và đánh giá độ ổn định khi lưu trữ trong điều kiện thích hợp trong 12 tháng (Bảng 3.8).

Bảng 3. 8 Đặc tính bộ mẫu chuẩn được phát triển nhằm đánh giá sinh phẩm chẩn đoán Realtime-PCR cho 14 týp HPV nguy cơ cao

Bộ mẫu chuẩn		Panel mẫu chuẩn thành viên				
		Độ nhạy phân tích	Độ đặc hiệu phân tích	Độ nhạy lâm sàng	Độ đặc hiệu lâm sàng	Độ chính xác
Đặc điểm của các thành viên mẫu chuẩn	Nguồn gốc mẫu	Mẫu plasmid HPV ADN	Mẫu bệnh phẩm lâm sàng	Mẫu bệnh phẩm lâm sàng	Mẫu bệnh phẩm lâm sàng	Mẫu plasmid HPD ADN pha trên nền mẫu bệnh phẩm lâm sàng
	Đặc tính mẫu HPV	Dương tính 14 týp HPV nguy cơ cao	Âm tính 14 týp HPV nguy cơ cao, dương tính 21 HPV nguy cơ thấp	Dương tính 14 HPV nguy cơ cao	Âm tính 14 HPV nguy cơ cao	Âm tính và dương tính
	Số lượng mẫu	14 mẫu plasmid	10 mẫu lâm sàng dương tính HPV nguy cơ thấp	60 mẫu lâm sàng dương tính	103 mẫu lâm sàng âm tính	4 mẫu (1 mẫu lâm sàng âm tính và 3 mẫu HPV ADN nồng độ dương tính cao, trung bình và thấp)
Số lượng thành viên/mẫu		20 ống/mẫu	20 ống/mẫu	20 ống/mẫu	20 ống/mẫu	20 ống/mẫu
Thể tích/ống		200 μ l/ống	200 μ l/ống	200 μ l/ống	200 μ l/ống	200 μ l/ống
Tổng số Bộ mẫu chuẩn		20 bộ				
Bảo quản		$\leq -20^{\circ}\text{C}$				

3.2.1 Panel mẫu chuẩn xác định độ nhạy phân tích

Dựa vào đặc tính kỹ thuật của mẫu và các đặc tính sau khi chia mẫu, nhóm nghiên cứu đã đưa ra tiêu chuẩn kỹ thuật cho Panel mẫu chuẩn xác định độ nhạy phân tích tại bảng 3.9.

Bảng 3. 9 Tiêu chuẩn kỹ thuật Panel độ nhạy phân tích

TT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn kỹ thuật
1	Số lượng	Đếm và quan sát	Panel độ nhạy phân tích gồm 14 mẫu thành viên tương ứng 14 týp HPV nguy cơ cao Mỗi mẫu đựng trong 1 tuýp riêng biệt. Bên ngoài mỗi týp có kí hiệu ID của từng mẫu
2	Cảm quan	Mắt thường	Dung dịch trong suốt, không màu Thể tích khoảng 200 µl/ống
3	Nhận dạng	PCR và giải trình tự	Dương tính và tương đồng về trình tự
4	Nồng độ	Digital PCR	Nồng độ ADN (bản sao/µl)
			RH16-E6E7 3,31 x 10 ⁶
			RH18-E6E7 2,22 x 10 ⁶
			RH39-E6E7 3,08 x 10 ⁶
			RH31-E6E7 2,60 x 10 ⁶
			RH45-E6E7 3,78 x 10 ⁶
			RH59-E6E7 1,61 x 10 ⁶
			RH33-E6E7 4,49 x 10 ⁶
			RH58-E6E7 4,02 x 10 ⁶
			RH35-E6E7 1,82 x 10 ⁶
			RH56-E6E7 1,55 x 10 ⁶
			RH66-E6E7 4,72 x 10 ⁶
			RH68-E6E7 1,21 x 10 ⁶
			RH52-E6E7 9,29 x 10 ⁶
			RH51-E6E7 2,80 x 10 ⁶
5	Độ ổn định	Realtime PCR	Các mẫu trong panel duy trì ổn định sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ bảo quản thực (≤-20°C)*

* Xem kết quả ở phụ lục 2

Panel mẫu chuẩn sử dụng cho xác định độ nhạy phân tích bao gồm 14 plasmid tái tổ hợp có chứa các gen mục tiêu (E6-E7) của 14 kiểu gen HPV nguy cơ cao được sử dụng là các mẫu chuẩn dương tính có nồng độ xác định. Các mẫu plasmid được xác định nồng độ bằng phương pháp digital PCR, đây là nồng độ mẫu chuẩn gốc. Panel chuẩn gốc được pha tạo 20 bộ mẫu chuẩn làm việc, mỗi mẫu chứa 200 µl/ống,

pha với dung dịch Tris - EDTA (TE) về nồng độ khoảng 10^6 bản sao/ μ l. Mẫu này được bảo quản trong điều kiện $\leq -20^\circ\text{C}$, khi sử dụng thử nghiệm panel mẫu chuẩn làm việc cần phải tiếp tục được pha về độ pha loãng: 1, 5, 10, 50, 100 và 1000 bản sao/ μ l để tạo các dãy nồng độ chuẩn khác nhau để tiến hành xác định độ nhạy phân tích (Bảng 3.10).

Bảng 3. 10 Danh mục Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ nhạy phân tích

TT	Týp	Tên mẫu	Nồng độ gốc	Nồng độ làm việc	Nồng độ					
			(bản sao/µl)							
1	HPV16	RH16-E6E7	3,31 x 10 ¹⁰	3,31 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
2	HPV18	RH18-E6E7	2,22 x 10 ¹⁰	2,22 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
3	HPV31	RH31-E6E7	2,60 x 10 ¹⁰	2,60 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
4	HPV33	RH33-E6E7	4,49 x 10 ⁹	4,49 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
5	HPV35	RH35-E6E7	1,82 x 10 ¹⁰	1,82 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
6	HPV39	RH39-E6E7	3,08 x 10 ¹⁰	3,08 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
7	HPV45	RH45-E6E7	3,78 x 10 ¹⁰	3,78 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
8	HPV51	RH51-E6E7	2,80 x 10 ¹⁰	2,80 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
9	HPV52	RH52-E6E7	9,29 x 10 ⁹	9,29 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1

TT	Týp	Tên mẫu	Nồng độ gốc	Nồng độ làm việc	Nồng độ					
			(bản sao/μl)							
10	HPV56	RH56-E6E7	1,55 x 10 ¹⁰	1,55 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
11	HPV58	RH58-E6E7	4,02 x 10 ⁸	4,02 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
12	HPV59	RH59-E6E7	1,61 x 10 ¹⁰	1,61 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
13	HPV66	RH66-E6E7	4,72 x 10 ⁹	4,72 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1
14	HPV68	RH68-E6E7	1,21 x 10 ⁹	1,21 x 10 ⁶	1000	100	50	10	5	1

3.2.2 Panel mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu phân tích

Kết quả thiết lập tiêu chuẩn kỹ thuật cho bộ Panel mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu phân tích tại bảng 3.11.

Bảng 3. 11 Tiêu chuẩn kỹ thuật Panel độ đặc hiệu phân tích

TT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn kỹ thuật
1	Số lượng	Đếm và quan sát	Panel độ đặc hiệu phân tích gồm 10 mẫu thành viên dương tính với các týp HPV nguy cơ thấp, âm tính 14 týp HPV nguy cơ cao Mỗi mẫu đựng trong 1 ống riêng biệt. Bên ngoài mỗi týp có kí hiệu ID của từng mẫu
2	Cảm quan	Mắt thường	Dung dịch trong suốt, hơi đục, có thể ngả sang màu vàng Thể tích khoảng 200 μl/ống

TT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn kỹ thuật
3	Nhận dạng	PCR, lai phân tử và Realtime PCR	Dương tính với các týp HPV nguy cơ thấp Âm tính 14 týp HPV nguy cơ cao
4	Độ ổn định	Realtime PCR	Các mẫu trong panel duy trì ổn định sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ bảo quản thực ($\leq -20^{\circ}\text{C}$)*

* Xem kết quả ở phụ lục 2

Panel mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu phân tích cho 14 týp HPV nguy cơ cao để đánh giá độ đặc hiệu phân tích thông qua kết quả đánh giá phản ứng chéo với các týp HPV nguy cơ thấp. Trong đó, 10 mẫu chuẩn dương tính với các týp HPV nguy cơ thấp của bộ mẫu chuẩn được sử dụng làm mẫu đánh giá, gồm HPV 53, HPV 61, HPV 70, HPV 81, HPV 82, HPV 54/55, 84/26, HPV 43/44, HPV 40/61, 81, HPV 40/61, 57/71, HPV 42, 84/26 (Bảng 3.12).

Bảng 3. 12 Danh mục Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ đặc hiệu phân tích

TT	Tên mẫu	Kết quả bởi PCR-PGMY(*)	Kết quả định týp HPV bởi Genoflow (*)	Kết quả định týp HPV bởi Sacace (*)	Đặc tính mẫu (*)
1	N21001	DT	HPV 53	AT	AT nguy cơ cao DT HPV 53
2	N21002	DT	HPV 61	AT	AT nguy cơ cao DT HPV 61
3	N21003	DT	HPV 70	AT	AT nguy cơ cao DT HPV 70
4	N21004	DT	HPV 54/55;84/26	AT	AT nguy cơ cao DT HPV 54/55;84/26
5	N21005	DT	HPV 43/44	AT	AT nguy cơ cao DT HPV 43/44
6	N21006	DT	HPV 40/61; 81	AT	AT nguy cơ cao

TT	Tên mẫu	Kết quả bởi PCR-PGMY(*)	Kết quả định tít HPV bởi Genoflow (*)	Kết quả định tít HPV bởi Sacace (*)	Đặc tính mẫu (*)
					DT HPV 40/61; 81
7	N21007	DT	HPV 40/61; 57/71	AT	AT nguy cơ cao DT HPV 40/61; 57/71
8	N21008	DT	HPV 42; 84/26	AT	AT nguy cơ cao DT HPV 42; 84/26
9	N21009	DT	HPV 81	AT	AT nguy cơ cao DT HPV 81
10	N21010	DT	HPV 82	AT	AT nguy cơ cao DT HPV 82

* Mẫu dương tính với các tít HPV (DT), mẫu âm tính với các tít HPV (AT)

3.2.3 Panel mẫu chuẩn xác định độ nhạy lâm sàng

Kết quả thiết lập tiêu chuẩn kỹ thuật cho Panel mẫu chuẩn xác định độ nhạy lâm sàng tại bảng 3.13.

Bảng 3. 13 Tiêu chuẩn kỹ thuật Panel độ nhạy lâm sàng

TT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn kỹ thuật
1	Số lượng	Đếm và quan sát	Panel độ nhạy lâm sàng gồm 60 mẫu thành viên. Mỗi mẫu đựng trong 1 ống riêng biệt. Bên ngoài mỗi tít có kí hiệu ID của từng mẫu
2	Cảm quan	Mắt thường	Dung dịch không trong suốt, hơi đục, có thể ngả sang màu vàng Thể tích khoảng 200 µl/ống

TT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn kỹ thuật
3	Nhận dạng	PCR, lai phân tử và Realtime PCR	Dương tính với 14 týp nguy cơ cao
4	Độ ổn định	Realtime PCR	Các mẫu trong panel duy trì ổn định sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ bảo quản thực ($\leq -20^{\circ}\text{C}$)*

* Xem kết quả ở phụ lục 2

Bộ mẫu chuẩn xác định độ nhạy lâm sàng sử dụng để thiết lập bao gồm các mẫu bệnh phẩm đã được khẳng định dương tính với từng týp HPV. Theo khuyến cáo của Tổ chức y tế Thế giới (WHO), bộ mẫu chuẩn được sử dụng đánh giá nên có ít nhất 60 mẫu lâm sàng dương tính với các týp HPV, thu thập từ các vùng địa lý khác nhau, được lưu hành ở lãnh thổ/quốc gia đó [175]. Trong nghiên cứu này, mẫu lâm sàng đã được chia 20 ống/mẫu, 200 μl /ống từ 60 mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính 14 týp HPV nguy cơ cao. Đặc tính mẫu của các bộ mẫu chuẩn được xét nghiệm bằng 1 quy trình PCR với cặp mồi đặc hiệu PGMY09/PGMY01 của Tổ chức y tế Thế giới (WHO) để sàng lọc và khẳng định bằng 2 bộ sinh phẩm thương mại bao gồm HPV Genotypes 14 RealTM Quant (Sacace, Ý) và GenoflowTM HPV array test kit (Diagcor, Hong Kong) đạt IVD/CE và WHO đánh giá. Đặc tính mẫu được kết luận dựa trên sự đồng nhất của 3 phương pháp đánh giá (Bảng 3.14).

Bảng 3. 14 Danh mục Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ nhạy lâm sàng

TT	Tên mẫu	Kết quả bởi PCR-PGMY(*)	Kết quả định týp HPV bởi Genoflow (*)	Kết quả định týp HPV bởi Sacace (*)	Đặc tính mẫu (*)
1	N21101	DT	HPV 18;51	HPV 18;51	HPV 18;51
2	N21102	DT	HPV 16	HPV 16	HPV 16

TT	Tên mẫu	Kết quả bởi PCR-PGMY(*)	Kết quả định tít HPV bởi Genoflow (*)	Kết quả định tít HPV bởi Sacace (*)	Đặc tính mẫu (*)
3	N21103	DT	HPV 18;51	18;51	18;51
4	N21104	DT	HPV 16;18;51;52;58	HPV16;18;51;52;58	HPV16;18;51;52;58
5	N21105	DT	HPV 16;31;59	HPV 16;31;59	HPV 16;31;59
6	N21106	DT	HPV 16;51;56	HPV 16;51;56	HPV 16;51;56
7	N21107	DT	HPV 18;51	HPV 18;51	HPV 18;51
8	N21108	DT	HPV 16;59	HPV 16;59	HPV 16;59
9	N21109	DT	HPV 16	HPV 16	HPV 16
10	N21110	DT	HPV 16;18;56;66/68	HPV 16;18;56	HPV 16;18;56
11	N21111	DT	HPV 16;18	HPV 16;18	HPV 16;18
12	N21112	DT	HPV 16;52;58;66/68;51	HPV 16;52;58;51	HPV 16;52;58;51
13	N21113	DT	HPV 16	HPV 16	HPV 16
14	N21114	DT	HPV 18	HPV 18	HPV 18
15	N21115	DT	HPV 16	HPV 16	HPV 16
16	N21116	DT	HPV 16	HPV 16	HPV 16
17	N21117	DT	HPV 18	HPV 18	HPV 18
18	N21118	DT	HPV 16;39	HPV 16;39	HPV 16;39
19	N21119	DT	HPV 18	HPV 18	HPV 18
20	N21120	DT	HPV 18	HPV 18	HPV 18
21	N21121	DT	HPV 16;56	HPV 16;56	HPV 16;56
22	N21122	DT	HPV 16	HPV 16	HPV 16
23	N21123	DT	HPV 16;18;58;59	HPV 16;18;58;59	HPV 16;18;58;59
24	N21124	DT	HPV 16;52	HPV 16;52	HPV 16;52
25	N21125	DT	HPV 16	HPV 16	HPV 16
26	N21126	DT	HPV 18	HPV 18	HPV 18

TT	Tên mẫu	Kết quả bởi PCR-PGMY(*)	Kết quả định tít HPV bởi Genoflow (*)	Kết quả định tít HPV bởi Sacace (*)	Đặc tính mẫu (*)
27	N21127	DT	HPV 18	HPV 18	HPV 18
28	N21128	DT	HPV 31;52	HPV 31;52	HPV 31;52
29	N21129	DT	HPV 35;59	HPV 35;59	HPV 35;59
30	N21131	DT	HPV 52	HPV 52	HPV 52
31	N21132	DT	HPV 52	HPV 52	HPV 52
32	N21133	DT	HPV 31	HPV 31	HPV 31
33	N21134	DT	HPV 52;66/68	HPV 52;68	HPV 52;68
34	N21135	DT	HPV 58;81	HPV 58	HPV 58
35	N21136	DT	HPV 52;58	HPV 52;58	HPV 52;58
36	N21138	DT	HPV 51;52	HPV 51;52	HPV 51;52
37	N21139	DT	HPV 51	HPV 51	HPV 51
38	N21140	DT	HPV 45	HPV 45	HPV 45
39	N21141	DT	HPV 58	HPV 58	HPV 58
40	N21142	DT	HPV 56	HPV 56	HPV 56
41	N21143	DT	HPV 39	HPV 39	HPV 39
42	N21145	DT	HPV 58;66/68	HPV 58;68	HPV 58,68
43	N21146	DT	HPV 66/68	HPV 68	HPV 68
44	N21147	DT	HPV 31	HPV 31	HPV 31
45	N21148	DT	HPV 52;58;66/68	HPV 52;58;68	HPV 52;58;68
46	N21149	DT	HPV 51;59	HPV 51;59	HPV 51;59
47	N21150	DT	HPV 52	HPV 52	HPV 52
48	N21151	DT	HPV 31	HPV 31	HPV 31
49	N21152	DT	HPV 66/68	HPV 66	HPV 66
50	N21153	DT	HPV 39;66/68	HPV 39	HPV 39
51	N21154	DT	HPV 52	HPV 52	HPV 52
52	N21155	DT	HPV 66/68	HPV 66	HPV 66
53	N21156	DT	HPV 52	HPV 52	HPV 52

TT	Tên mẫu	Kết quả bởi PCR-PGMY(*)	Kết quả định týp HPV bởi Genoflow (*)	Kết quả định týp HPV bởi Sacace (*)	Đặc tính mẫu (*)
54	N21157	DT	HPV 31;51;52;81	HPV 31;51;52	HPV 31;51;52
55	N21158	DT	HPV 56	HPV 56	HPV 56
56	N21159	DT	HPV 58	HPV 58	HPV 58
57	N21160	DT	HPV 31;45;52	HPV 31;45;52	HPV 31;45;52
58	N21194	DT	HPV 16	HPV 16	HPV 16
59	N21200	DT	HPV 16;31;59	HPV 31;59	HPV 31, 59
60	N21207	DT	HPV 33;51;52	HPV 33;51;52	HPV 33;51;52

* Mẫu dương tính với các týp HPV (DT)

3.2.4 Panel mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu lâm sàng

Kết quả thiết lập tiêu chuẩn kỹ thuật cho Panel mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu lâm sàng được đưa ra tại bảng 3.15.

Bảng 3. 15 Tiêu chuẩn kỹ thuật Panel xác định độ đặc hiệu lâm sàng

TT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn kỹ thuật
1	Số lượng	Đếm và quan sát	Panel độ đặc hiệu lâm sàng gồm 103 mẫu thành viên. Mỗi mẫu đựng trong 1 ống riêng biệt. Bên ngoài mỗi týp có kí hiệu ID của từng mẫu
2	Cảm quan	Mắt thường	Dung dịch không trong suốt, hơi đục, có thể ngả sang màu vàng Thể tích khoảng 200 µl/ống
3	Nhận dạng	PCR, lai phân tử và Realtime PCR	Âm tính 14 HPV nguy cơ cao
4	Độ ổn định	Realtime PCR	Các mẫu trong panel duy trì ổn định sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ bảo quản thực ($\leq -20^{\circ}\text{C}$)*

* Xem kết quả ở phụ lục 2

Bộ mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu lâm sàng gồm các mẫu bệnh phẩm lâm sàng được xác định âm tính với các týp HPV. Bộ mẫu chuẩn này theo khuyến cáo của WHO cần tối thiểu từ 100 mẫu bệnh phẩm lâm sàng [175]. Nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng được tổng số 20 bộ mẫu, mỗi mẫu 200µl từ 103 mẫu lâm sàng âm tính, trong đó 10 mẫu dương tính với 21 HPV nguy cơ thấp, âm tính với 14 týp HPV nguy cơ cao và 93 mẫu âm tính với toàn bộ các týp HPV bằng các phương pháp sàng lọc và khẳng định đặc tính mẫu (Bảng 3.16).

Bảng 3. 16 Danh mục Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ đặc hiệu lâm sàng

TT	Tên mẫu	Kết quả bởi PCR-PGMY(*)	Kết quả định týp HPV bởi Genoflow (*)	Kết quả định týp HPV bởi Sacace(*)	Đặc tính mẫu (*)
1	N21001	DT	HPV 53	AT	AT
2	N21002	DT	HPV 61	AT	AT
3	N21003	DT	HPV 70	AT	AT
4	N21004	DT	HPV 54/55;84/26	AT	AT
5	N21005	DT	HPV 43/44	AT	AT
6	N21006	DT	HPV 40/61; 81	AT	AT
7	N21007	DT	HPV 40/61; 57/71	AT	AT
8	N21008	DT	HPV 42; 84/26	AT	AT
9	N21009	DT	HPV 81	AT	AT
10	N21010	DT	HPV 82	AT	AT
11-100	N21011-N21100	AT	AT	AT	AT
101	N21130	AT	AT	AT	AT
102	N21137	AT	AT	AT	AT

TT	Tên mẫu	Kết quả bởi PCR-PGMY(*)	Kết quả định týp HPV bởi Genoflow (*)	Kết quả định týp HPV bởi Sacace(*)	Đặc tính mẫu (*)
103	N21144	AT	AT	AT	AT

*: Mẫu dương tính với các týp HPV (DT), Mẫu âm tính với HPV nguy cơ cao

3.2.5 Panel mẫu chuẩn xác định độ chính xác

Kết quả thiết lập tiêu chuẩn kỹ thuật cho Panel mẫu chuẩn xác định độ chính xác được đưa ra tại bảng 3.17.

Bảng 3. 17 Tiêu chuẩn kỹ thuật Panel xác định độ chính xác

TT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn kỹ thuật
1	Số lượng	Đếm và quan sát	Panel độ chính xác gồm 4 mẫu thành viên/ týp HPV. Mỗi mẫu đựng trong 1 ống riêng biệt. Bên ngoài mỗi týp có kí hiệu ID của từng mẫu
2	Cảm quan	Mắt thường	Dung dịch không trong suốt, hơi đục, có thể ngả sang màu vàng Thể tích mỗi mẫu là khoảng 200µl
3	Nhận dạng	PCR, giải trình tự và Realtime PCR	Dương tính với mẫu dương tính Âm tính với mẫu lâm sàng âm tính
5	Độ ổn định	Realtime PCR	Các mẫu trong bộ panel duy trì ổn định sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ bảo quản thực ($\leq -20^{\circ}\text{C}$)*

* Xem kết quả ở phụ lục 2

Panel mẫu chuẩn xác định độ chính xác cho 14 týp HPV nguy cơ cao, panel mẫu này được tạo ra bằng cách trộn các mẫu chuẩn plasmid HPV ADN của 14 týp tương ứng vào nền mẫu lâm sàng âm tính để đạt được nồng độ mẫu thành viên gồm

3 mẫu dương tính và 1 mẫu lâm sàng âm tính. Trong đó, nền mẫu lâm sàng được lấy từ những mẫu bệnh phẩm âm tính hoàn toàn với HPV được tiến hành tách chiết thu ADN.

Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ chính xác bao gồm 4 thành viên: 1 mẫu âm tính, 1 mẫu dương tính thấp, 1 mẫu dương tính trung bình và 1 mẫu dương tính cao (Bảng 3.18). Mẫu chuẩn plasmid HPV ADN tại nồng độ làm việc gốc 10^6 bản sao/ μ l sẽ được pha loãng về nồng độ mẫu dương tính cao (HPV16/HPV18 là 50 bản sao/ μ l, 12 týp còn lại là 1000 bản sao/ μ l), dương tính trung bình (HPV16/HPV18 là 10 bản sao/ μ l, 12 týp còn lại là 100 bản sao/ μ l) và dương tính thấp (HPV16/HPV18 là 5 bản sao/ μ l, 12 týp còn lại là 50 bản sao/ μ l) bằng nền mẫu bệnh phẩm lâm sàng âm tính. Mỗi mẫu trong bộ mẫu có thể tích 200 μ l/ống. Panel mẫu này sẽ được thực hiện khi tiến hành thử nghiệm.

Trong đó SHPV_N là các mẫu âm tính, SHPV_L là các mẫu có nồng độ thấp, SHPV_M là các mẫu có nồng độ trung bình và SHPV_H là các mẫu có nồng độ cao.

Bảng 3. 18 Danh mục bộ mẫu chuẩn HPV xác định độ chính xác

TT	Týp HPV	Mẫu âm tính	Mẫu dương tính thấp		Mẫu dương tính trung bình		Mẫu dương tính cao	
			Tên mẫu	Nồng độ (bản sao/µl)	Tên mẫu	Nồng độ (bản sao/µl)	Tên mẫu	Nồng độ (bản sao/µl)
1	HPV 16	S16N	S16L	5	S16M	10	S16H	50
2	HPV 18	S18N	S18L	5	S18M	10	S18H	50
3	HPV 39	S39N	S39L	50	S39M	100	S39H	1000
4	HPV 31	S31N	S31L	50	S31M	100	S31H	1000
5	HPV 45	S45N	S45L	50	S45M	100	S45H	1000
6	HPV 59	S59N	S59L	50	S59M	100	S59H	1000
7	HPV 33	S33N	S33L	50	S33M	100	S33H	1000
8	HPV 58	S58N	S58L	50	S58M	100	S58H	1000
9	HPV 35	S35N	S35L	50	S35M	100	S35H	1000
10	HPV 56	S56N	S56L	50	S56M	100	S56H	1000
11	HPV 66	S66N	S66L	50	S66M	100	S66H	1000
12	HPV 68	S68N	S68L	50	S68M	100	S68H	1000
13	HPV 52	S52N	S52L	50	S52M	100	S52H	1000
14	HPV 51	S51N	S51L	50	S51M	100	S51H	1000

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1 Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018

4.1.1 Đặc điểm nhân khẩu học và nhiễm HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018

HPV gây u nhú ở người là bệnh nhiễm trùng lây truyền qua đường tình dục phổ biến nhất ở phụ nữ và nhiễm HPV có thể xảy ra ở mọi lứa tuổi, bao gồm cả ở những người trẻ, khỏe mạnh. Trong đó, tỷ lệ nhiễm các týp HPV nguy cơ cao đều có thể dẫn đến sự phát triển của UTCTC, là một trong các loại ung thư phổ biến ở phụ nữ [70]. Bên cạnh đó, một số nhóm đối tượng khác cũng có nguy cơ cao lây nhiễm HPV như MSM và PNBD [49, 148]. Đây là một trong số các nguyên nhân các nhóm đối tượng sinh viên, PNBD, MSM được lựa chọn vào nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, 2989 mẫu bệnh phẩm trên 3 nhóm đối tượng gồm 799 MSM, 699 phụ nữ bán dâm và 1491 nữ sinh viên đã được lựa chọn để đưa vào phân tích. Kết quả sàng lọc và xác định nhiễm các týp HPV cho thấy, tỷ lệ nhiễm HPV của MSM, PNBD và sinh viên lần lượt là 29,8%, 26,3% và 4,2%. Kết quả này cho thấy, các đối tượng có các hành vi nguy cơ cao lây nhiễm bệnh qua đường tình dục như MSM và PNBD có tỷ lệ lây nhiễm HPV cao hơn nhóm đối tượng nữ sinh viên. Mặc dù nhiễm HPV có thể xảy ra ở bất kỳ lứa tuổi nào nhưng các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng nhiễm HPV tuân theo đường cong hình chữ U với đỉnh đầu tiên ở phụ nữ dưới 30 tuổi và đỉnh thứ hai ở phụ nữ trong độ tuổi 55-64. Trong nghiên cứu của B, Gao và cộng sự (2021), tuổi của các bệnh nhân UTCTC được chọn vào nghiên cứu từ 19–84 tuổi. Trong đó, tuổi trung bình của bệnh nhân UTCTC có nhiễm HPV là 43,8 tuổi [70].

Trong nghiên cứu này, nhóm tuổi ở PNBD tập trung chủ yếu ở khoảng tuổi 30–39 (42,5%), nhóm tuổi của MSM tập trung chủ yếu ở khoảng tuổi 25–35 (46,2%) và khoảng tuổi 16–24 (37,1%). Đây cũng là khoảng tuổi có nhiều hành vi nguy cơ lây nhiễm HPV trong quan hệ tình dục ở hai nhóm đối tượng PNBD và MSM. Các

nghiên cứu cũng chỉ ra nguy cơ nhiễm HPV cũng gia tăng theo xu hướng của các mức độ thoái hóa xã hội, tức là theo xu hướng tăng của các hành vi nguy cơ trong quan hệ tình dục. Trong đó, các hành vi nguy cơ không chỉ tồn tại ở các nhóm nguy cơ cao như PNBD hoặc MSM, mà còn ở các nhóm khác, trong đó có nhóm nữ sinh viên. Nhìn chung các nghiên cứu HPV tại Việt Nam chủ yếu tập trung vào nhóm phụ nữ đã lập gia đình sử dụng các phương pháp lấy mẫu xâm lấn. Tuy nhiên, nhóm thanh thiếu niên và người trưởng thành trẻ tuổi ở Việt Nam cũng có những thay đổi nhanh chóng trong thái độ và hành vi tình dục ba thập kỷ qua do sự tăng trưởng kinh tế và sự thay đổi mạnh mẽ về chính trị tại Việt Nam. Do đó số liệu thu được từ nhóm phụ nữ 40 tuổi khó có thể đại diện được cho tỷ lệ nhiễm HPV ở những phụ nữ trẻ. Nhiều thông tin cho rằng kết thúc trung học là thời điểm hầu hết các thiếu nữ bắt đầu có hành vi QHTD, đồng nghĩa với việc có nguy cơ cao bị lây nhiễm HPV. Theo một khảo sát đánh giá của thanh niên Việt Nam (SAVY II), QHTD trước hôn nhân ngày càng tăng giữa các thanh niên trong độ tuổi 15-24 từ 7,6% năm 2003 lên 9,5% trong năm 2008 và tuổi bắt đầu hoạt động tình dục thấp hơn cũng được ghi nhận với tuổi trung bình là 19,6 tuổi vào năm 2003 và 18,1 tuổi vào năm 2008. Điều này cũng có nghĩa là QHTD có thể xảy ra lần đầu tiên ngay trong giai đoạn học phổ thông. Do đó, nhóm phụ nữ trẻ mới chính là đối tượng cần được tập trung ưu tiên chủng ngừa vắc xin phòng HPV [45, 154]. Theo nghiên cứu của J, K, Oh và cộng sự tại Hàn Quốc (2008), trong số phụ nữ từ 16-18 tuổi, nhiễm HPV thường xảy ra khi họ học tại các trường đại học hay các trường học ở vùng nông thôn, đồng thời cho thấy một xu hướng tăng tỷ lệ nhiễm cùng với sự tăng mức độ thoái hóa xã hội. Thông tin về hành vi tình dục và tỷ lệ nhiễm mới trong nhóm sinh viên đại học này có thể được sử dụng như một công cụ giáo dục để nâng cao nhận thức về sự lây nhiễm HPV [118]. Một số nghiên cứu cũng công bố kết quả phát hiện nhiễm HPV ở nhóm đối tượng nữ thiếu niên độ tuổi 15-18 tuổi trước khi có QHTD [117].

Nguy cơ mắc UTCTC và UTHM liên quan chặt chẽ với thực trạng mắc HPV ở các nhóm đối tượng nguy cơ cao. Trong nghiên cứu này việc nhiễm đa tốp HPV đã được tìm thấy ở cả 3 nhóm đối tượng nghiên cứu là MSM, PNBD và nữ sinh viên với

tỷ lệ rất cao lần lượt là 23,4%, 18,2% và 2,5%. Đối với các trường hợp nhiễm đơn, tỷ lệ nhiễm bất kỳ đối với các týp HPV ở nhóm MSM, PNBD, sinh viên lần lượt là 6,4%, 8,0% và 1,7%. Tỷ lệ mẫu nhiễm đa týp chiếm tỷ lệ cao gấp 2-4 lần các mẫu nhiễm đơn týp. Tỷ lệ nhiễm HPV nguy cơ cao trên nhóm đối tượng MSM cao nhất chiếm 24,0% theo sau là PNBD (17,6%) và nữ sinh viên (3,4%). Trong đó, đối với các týp HPV16/18 tỷ lệ nhiễm ở các nhóm tương ứng là 10,6%, 4,0 % và 0,7 %.

Tuy nhiên, sự phân bố các nhiễm HPV nguy cơ cao ở nhóm MSM, PNBD, nữ sinh viên rất cao tương ứng 80,7%, 66,8% và 79,4%. Bên cạnh đó, sự phân bố nhiễm đa týp so với đơn týp trên 3 nhóm MSM, PNBD, sinh viên là 78,6%, 69,0% và 60,3% so với 21,4%, 30,4% và 39,7%. Sự phân bố các týp HPV nguy cơ cao vẫn chiếm tỷ lệ cao trên 66,8% và phân bố của HPV16/18 của MSM chiếm 35,7% cao gấp 2 lần so với 2 nhóm đối tượng còn lại và HPV 16/18 vẫn là týp HPV nguy cơ cao có tỷ lệ nhiễm phổ biến, tương tự như các nghiên cứu khác trên thế giới. Nghiên cứu của A, Nielsen tại Đan Mạch, trong số các týp vi rút xác định được, HPV 16, 18 và 35 có tỷ lệ nhiễm mới cao nhất. Tỷ lệ nhiễm mới týp HPV nguy cơ cao ở phụ nữ Đan mạch, tuổi từ 20-29 là 12,8% trong 2 năm theo dõi, Các týp vi rút phổ biến nhất là HPV16, HPV31, HPV52, HPV66, HPV58 và HPV53 [113, 114].

Thực trạng nhiễm HPV là khác nhau ở các nhóm đối tượng khác nhau liên quan tới các nhóm hành vi nguy cơ cao. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm HPV ở nhóm MSM PNBD là cao nhất (29,8%), tiếp theo đến nhóm PNBD (26,4%) và thấp nhất là nhóm nữ sinh viên (4,2%). Từ kết quả này cho thấy, các nhóm có hành vi nguy cơ cao về hành vi tình dục PNBD và MSM có tỷ lệ nhiễm HPV cao gấp khoảng từ 6-8 lần so với nhóm nữ sinh viên. Theo kết quả nghiên cứu cho thấy độ tuổi của nhóm MSM chủ yếu khoảng 25-35 tuổi (46,2%) và dưới 25 tuổi (37,1%), cụ thể là Hà Nội có 41,3% MSM dưới 25 tuổi và 49,4% từ 25-35 tuổi; Tp.HCM có 32,8% MSM dưới 25 tuổi và 43,0% từ 25-35 tuổi.

Kết quả này thấp hơn so với điều tra các chỉ số sinh học kết hợp với hành vi năm 2013, nhóm tuổi dưới 25 chiếm 66,9% tại Hà Nội, 50,7% tại Tp.HCM và cao

nhất tại Cần Thơ với 94,5% [10]. Kết quả nghiên cứu chỉ ra, sự khác biệt với số liệu giám sát trọng điểm năm 2016 với nhóm MSM dưới 25 tuổi trung bình là 42%, trong đó, Hà Nội là 32,5% [11]. Như vậy, nhóm MSM hầu hết đang ở độ tuổi khá trẻ, đây cũng là độ tuổi dễ bị ảnh hưởng bởi những tác động xấu của xã hội. Hầu hết nhóm MSM tham gia nghiên cứu nằm trong nhóm chưa kết hôn (90,1%), họ thường sống một mình (30,2%) hay sống với bạn (25,7%). Ngoài ra, một số ít MSM đang sống với vợ/người yêu/bạn tình (10,4%) và nhóm khác (33,8%) (chủ yếu là sống với gia đình). Vì đây là nhóm đối tượng khá trẻ nên nhóm này dễ bị ảnh hưởng về nhận thức, tâm lý cũng như hành vi từ những người xung quanh. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ nhiễm HPV của nhóm MSM tại 2 thành phố lớn của Việt Nam là 29,8% trong đó Tp.HCM cao hơn Hà Nội (33,0% và 26,6%), thấp hơn tỷ lệ nhiễm HPV ở PNBD trong nghiên cứu trên 479 PNBD ở Hải Phòng với tỷ lệ 51,1% [3]. Tỷ lệ nhiễm HPV ở nam giới hành nghề bán dâm ở Tp.HCM ghi nhận ở mức cao (59,1%), nhưng tại Hà Nội lại ở mức thấp (4,6%) theo kết quả nghiên cứu vào năm 2009-2011 [45]. Nhóm MSM, PNBD và nam giới hành nghề mại dâm đều có tỷ lệ cao nhiễm HPV, bởi đây là những nhóm đối tượng có các hành vi nguy cơ cao lây nhiễm các bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm cả HIV. Một nghiên cứu tại Peru, có đến 77,1% người nhiễm HPV trong nhóm MSM tìm kiếm dịch vụ chăm sóc sức khỏe tại Trung tâm Y tế Alberto Barton [131]. Trung tâm kiểm soát bệnh tật Hoa Kỳ cũng cho thấy tỷ lệ cao hiện mắc bất kỳ tít HPV nào ở người trưởng thành trong độ tuổi 18-59 là 45,2% ở nam và 39,9% ở nữ [102]. HPV là bệnh lây truyền qua đường tình dục phổ biến nhất ở Hoa Kỳ [142]. Từ các kết quả trên cho thấy, tỷ lệ nhiễm HPV đang khá cao trong nhóm MSM. Đây trở thành vấn đề sức khỏe đáng quan tâm trên nhóm này bởi sự kỳ thị của xã hội còn cao và tiếp cận với các dịch vụ chăm sóc sức khỏe còn nhiều hạn chế. Theo nghiên cứu, tỷ lệ nhiễm bất kỳ tít nguy cơ cao nào là 24,0%, thấp hơn so với nghiên cứu tại Peru là 49,5% [131]. Tỷ lệ này ở người lớn trưởng thành trong độ tuổi 18-59 tại Hoa Kỳ là 25,1% và 20,4% [102]. Tỷ lệ nhiễm HPV tít 6/11 là 10,8% và tít 16/18 là 10,6% thấp hơn so với báo cáo của Tổ chức Y tế thế

giới năm 2018 ước tính HPV 16 và 18 được tìm thấy trong 72% ca bệnh và HPV 31, 33, 45, 52 và 58 có trong 17% trường hợp [53].

Tại thành phố Hồ Chí Minh và Hà Nội là hai thành phố lớn nhất Việt Nam, kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ PNBD bị nhiễm HPV chiếm 29,8%. Kết quả này khác với hai nghiên cứu trước đây chỉ ra sự khác biệt với số lượng đối tượng nhiễm HPV tại miền Nam Việt Nam (85%) cao hơn nhiều so với tỷ lệ mắc tại miền Bắc (49,5%) [76, 79]. Tỷ lệ này thấp hơn với kết quả của các nghiên cứu Hải Phòng năm 2012 và các tỉnh miền nam Việt Nam năm 2008 (với tỷ lệ lần lượt là 51,1% và 85%) [3, 76]. Bên cạnh đó, kết quả này phù hợp với nghiên cứu tổng quan trên 9 quốc gia châu Á với tỷ lệ nhiễm HPV dao động từ 12,8% đến 84,3% [124] và thấp hơn so với các nước trong khu vực Trung Quốc (38,9%) [93], Campuchia (41,1%) [48], Thái Lan (47%) [155] và so với một số nghiên cứu ở châu Phi cũng có tỷ lệ thấp hơn (45,5%-100%) [58, 97, 100]. Nhiều nghiên cứu cũng đã chỉ ra ảnh hưởng của độ tuổi trung bình ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm HPV [2, 6, 146]. Do đó, tỷ lệ nhiễm HPV trong nghiên cứu này thấp hơn so một số nghiên cứu tại Việt Nam có thể được giải thích do tuổi trung bình tại nghiên cứu này cao hơn (37 tuổi), nhóm PNBD dưới 25 tuổi chiếm tỷ lệ thấp hơn, trình độ học vấn trung học phổ thông và đại học cao đẳng chiếm tỷ lệ cao (27,6%) so với nghiên cứu miền nam Việt Nam năm 2008 cũng nghiên cứu tại Hải Phòng [25, 76]. Vì vậy, họ có khả năng tiếp cận tốt với những thông tin cập nhật nhất về HPV hay UTCTC. Phần lớn đối tượng nghiên cứu chưa kết hôn (15,7%) hoặc đã ly thân/ly dị/góa (59,9%). Bên cạnh đó, tỷ lệ PNBD hiện sống một mình chiếm tỷ lệ cao với 33,1%. Những PNBD thuộc nhóm này thường sẽ có xu hướng bị ảnh hưởng không tốt về nhận thức và hành vi so với nhóm đã kết hôn, sống với người thân và gia đình. Vị trí địa lý và văn hóa của các nước khác nhau ở các châu lục khác nhau cũng ảnh hưởng đến nhận thức và hành vi của nhóm đối tượng này. Vì thế dẫn đến tỷ lệ nhiễm HPV của nhóm PNBD trong nghiên cứu này thấp hơn so với các châu lục khác [146]. Tỷ lệ nhiễm bất cứ týp HPV nào cao nhất ở nhóm phụ nữ 30-39 tuổi và thấp nhất ở nhóm phụ nữ độ tuổi 50-59 tuổi. Kết quả trên tương tự với nghiên cứu của Lê Trung Thọ trên đối tượng phụ nữ sống tại Hà Nội năm 2018 [7]

và nghiên cứu của Gurel Ersan trên đối tượng PNBD đang làm việc tại Izmir, Thổ Nhĩ Kỳ năm 2013 [63]. Tuy nhiên kết quả này lại khác so với nghiên cứu tại miền nam Việt Nam năm 2008 trên đối tượng PNMD với tỷ lệ ngang bằng nhau ở tất cả các nhóm tuổi [76]. Nghiên cứu tổng quan toàn cầu trên phụ nữ năm 2006 cho thấy tỷ lệ nhiễm HPV có đỉnh ở độ tuổi dưới 25 ở đa số các nước bao gồm Hà Lan, Nhật, Tây Ban Nha, Argentina, Chi-lê, Colombia, Thái Lan trong khi Mexico có chiếm tỷ lệ cao nhất lại ở độ tuổi dưới 25 và trên 55 tuổi [67].

Theo một số nghiên cứu, tỷ lệ nhiễm HPV cổ tử cung ở PNBD ở châu Á dao động từ 12,8% đến 84,8%, cao hơn 10 lần so với dân số phụ nữ nói chung [122, 138]. Nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ nhiễm HPV ở nhóm gái bán dâm Đông Á cao hơn so với các tiểu vùng khác của châu Á và tỷ lệ nhiễm HPV ở nhóm gái bán dâm trẻ cao hơn so với nhóm gái bán dâm lớn tuổi. Tương tự như vậy, phân bố kiểu gen HPV cũng khác nhau giữa hai vùng Đông Á và Đông Nam Á. Tại khu vực Đông Nam Á, các kiểu gen phổ biến nhất là HPV 16, 18, 58, 56 và 52, trong khi đó HPV 52, 16, 58, 18 và 66 phổ biến ở Đông Á. Các týp HPV 31, 33 và 35 thường ít xuất hiện ở cả hai tiểu vùng sông Mê Kông [122, 138]. Tại Vương Quốc Anh, tỷ lệ phát hiện ADN của HPV16 và 18 trong mẫu bệnh phẩm lấy từ đường sinh dục-hậu môn của MSM là 17%, tỷ lệ phát hiện 4 týp HPV 6, 11, 16 và 18 32,5% và 45,5% đối với 9 loại HPV có trong thành phần vắc xin 9 týp (Gardasil-9). Độ tuổi trung bình của QHTD qua đường hậu môn lần đầu tiên ở MSM là 19. Tỷ lệ nhiễm HPV ở hậu môn cao hơn nhiều ở nhóm MSM so với nhóm quan hệ khác giới MSW (47,2% so với 12,2%) [50, 54].

Ngoài nhiễm đơn thuần một týp HPV, đồng nhiễm các týp HPV cũng rất phổ biến. Trong nghiên cứu này, trong số đối tượng MSM nhiễm HPV, phân bố đa nhiễm các týp HPV lần lượt chiếm 78,6%. Tương tự như vậy, đối với các trường hợp nhiễm HPV trên PNBD, tỷ lệ đa nhiễm HPV cũng khá phổ biến là 69,0%. Trong số các trường hợp nữ sinh viên nhiễm HPV, tỷ lệ đa nhiễm týp HPV lên đến 60,3%. Kết quả này cho thấy, việc đồng nhiễm các týp HPV là khá phổ biến. Nghiên cứu của A, Nielsen tại Đan Mạch, khoảng 50% số phụ nữ có nhiễm HPV là đồng nhiễm cùng

một lúc nhiều týp vi rút. Tuổi là một trong số những yếu tố nguy cơ chính cho việc nhiễm mới, đặc biệt là nhiễm với nhiều loại HPV nguy cơ cao khác nhau [113, 114]. Amir Sohrabi và các cộng sự (2017) nghiên cứu trên 1387 mẫu bệnh phẩm sinh thiết cổ tử cung của phụ nữ tại Iran đến khám tại các bệnh viện, tỷ lệ dương tính với HPV là 40,6%. Trong đó, nhiều trường hợp được xác định đồng nhiễm hai, ba, bốn và năm týp HPV (57,5%, 26,2%, 10,6% và 5,7% [145]. Maria Luiza Nogueira Dias Genta và các cộng sự (2017) phân tích HPV ADN trên mẫu bệnh phẩm của 292 bệnh nhân cho thấy tỷ lệ đa nhiễm các týp HPV là 4% [115]. Tình trạng đồng nhiễm nhiều týp HPV (tương ứng với 69,4%) cao hơn so với chỉ nhiễm một týp. Kết quả này tương tự với nghiên cứu trên PNBD tại Hải Phòng và nghiên cứu trên phụ nữ tại Hà Nội của Lê Trung Thọ [7]. Tuy nhiên một số nghiên cứu tại Sennada và Kenya ở châu Phi lại cho thấy tỷ lệ nhiễm đơn týp chiếm tỷ lệ chủ yếu [59, 149]. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm HPV ở những người dưới 25 tuổi cao hơn so với những người trên 25 tuổi, sự khác biệt này được giải thích do liên quan đến hành vi tình dục, cụ thể là liên quan đến tuổi bắt đầu quan hệ tình dục và cách thực hiện các hoạt động tình dục [137]. Tỷ lệ PNBD trong nghiên cứu này có các hành vi nguy cơ liên quan đến nhiễm HPV cao, đây có thể làm tăng nguy cơ nhiễm HPV cho nhóm đối tượng. Một số nghiên cứu cho rằng những người có trình độ học vấn cao hơn có nguy cơ nhiễm thấp hơn, trong khi một số nghiên cứu khác vẫn còn tranh cãi về mối liên quan này [56, 107].

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm HPV lớn nhất ở phụ nữ trẻ ở Việt Nam, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ nhiễm HPV tương đối thấp (4,2%) và bất kỳ trường hợp nhiễm HPV nguy cơ cao nào (3,4%) ở Hà Nội, Huế và Tp. HCM so với tỷ lệ nhiễm HPV là báo cáo lên đến 26,8% ở phụ nữ từ 14 đến 59 tuổi ở các quốc gia khác [22]. Do tỷ lệ nhiễm HPV thấp ở các nữ sinh viên đại học chỉ mới bắt đầu hoạt động tình dục, nên tiêm vắc xin trước khi bắt đầu hoạt động tình dục là lý tưởng để bảo vệ họ khỏi mắc phải các kiểu gen HPV gây ung thư. Tỷ lệ nhiễm HPV nguy cơ cao không khác nhau ở ba thành phố của Việt Nam; thay vào đó, chúng tôi nhận thấy rằng các trường hợp nhiễm HPV nguy cơ cao phổ biến hơn ở các sinh viên từ các ngành khoa

học xã hội (tương ứng là 6,3% so với 1,8%). Chúng tôi không tìm hiểu lý do tại sao sinh viên khoa học xã hội có nguy cơ nhiễm HPV nguy cơ cao hơn sinh viên khoa học tự nhiên, nhưng có lẽ sinh viên khoa học xã hội có nhiều hoạt động tình dục hơn có thể là một yếu tố góp phần. Trong nghiên cứu của Hirohisa Imai ở Nhật Bản (2012), tổng số 125 phụ nữ (16,2% đối tượng có hoạt động tình dục) bị nhiễm HPV nguy cơ cao. Kiểu gen HPV nguy cơ cao phổ biến nhất là HPV 52 (tỷ lệ hiện mắc 6,4%), tiếp theo là HPV 16 (3,1%) và HPV 56 (3,0%). Tỷ lệ hiện nhiễm của HPV 16 và 18 lần lượt là 3,1% và 0,9%, và không có ai dương tính với cả hai loại [88].

Một nghiên cứu tại Đại học Bang Morelos ở Mexico của Antonia Herrera-Ortiz và cộng sự từ năm 2001 đến 2005 cho thấy tổng số 364 nữ đại học có độ tuổi trung bình là 21 tuổi (khoảng 20–22 tuổi), 85,3% là độc thân. Tỷ lệ lưu hành HR-HPV là 22,2%, HPV16 được phát hiện là 3,9%, HPV18 được phát hiện là 1,1% và các HR-HPV khác đã được phát hiện trong 19,1% trong số các mẫu [159]. Báo cáo tại Scotland, tỷ lệ nhiễm HPV ở phụ nữ trẻ từ 15 đến 18 tuổi là 15,2% đối với tất cả các loại HPV và 12,6% đối với các loại HPV nguy cơ cao [159]. Trong nghiên cứu đầu tiên nhằm kiểm tra dịch tễ học của HPV ở các cô gái đến từ châu Phi cận Sahara, những người tự cho biết mình chưa từng quan hệ tình dục qua đường âm đạo, tỷ lệ nhiễm HPV cao một cách đáng ngạc nhiên (8,4%) dựa trên xét nghiệm mẫu gạc âm đạo tự dùng. Con số này cao hơn so với 2 nghiên cứu trước đó ở những phụ nữ cho biết không có quan hệ tình dục trước đó 1 nghiên cứu trên 130 phụ nữ Thụy Điển từ 10–25 tuổi báo cáo tỷ lệ hiện mắc là 1,5% và 1 nghiên cứu về phụ nữ tại Hoa Kỳ từ 18–20 tuổi báo cáo rằng 1,7% trong số các mẫu xét nghiệm được tìm thấy có DNA của HPV [51]. Một nghiên cứu trên 202 phụ nữ bản địa trong độ tuổi từ 18 đến 60 sống ở Guatemala đã được mời thu thập mẫu cổ tử cung bằng cách sử dụng bộ công cụ HerSwab để đánh giá tình trạng nhiễm HPV và tự lấy mẫu. Kết quả cho thấy 178 (89%) phụ nữ đồng ý tự lấy mẫu, 79% phụ nữ thấy phương pháp này khá thoải mái, 91% cho biết dễ sử dụng và 100% cho biết họ sẵn sàng thực hiện để kiểm tra định kỳ theo phương pháp sàng lọc này [85]. Trong nghiên cứu này, các sinh viên tham gia nghiên cứu hoàn toàn đồng ý với phương pháp tự lấy mẫu và tin tưởng vào độ an toàn

cũng như khả năng lấy mẫu thành công. Một nghiên cứu của Akiko Kamimura vào năm 2016 trên tổng số 932 người tham gia đại học (495 ở Việt Nam và 437 ở Hoa Kỳ), những người tham gia Việt Nam có mức độ hiểu biết về HPV thấp hơn, nhiều rào cản hơn đối với việc tiêm phòng HPV và mức độ từ chối rủi ro cao hơn so với những người tham gia ở Hoa Kỳ. Tỷ lệ người Việt Nam đã tiêm vắc xin HPV (7,5%) thấp hơn nhiều so với người Mỹ đã tiêm vắc xin (42%) [121].

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm HPV ở nữ sinh viên tuy không ở mức cao chỉ khoảng 4,2%. Tuy nhiên, phân bố nhiễm HPV nguy cơ cao lên đến 79,4% và HPV16/18 là 15,9%. Trong đó, týp HPV 52 trong nhóm này chiếm tỷ lệ cao nhất trong nhóm nguy cơ cao 40,6% ở Huế, 16% ở Hà Nội, theo sau là HPV 39 là 24,0% ở Hà Nội, 12,5% ở Huế và HPV66 và 68 có tỷ lệ 18,8% ở Huế và 8,0% ở Hà Nội. Đáng lưu ý là HPV39 có tỷ lệ mắc cao thứ 2 trong nhóm nguy cơ cao lại không có trong vắc xin. Điều này, có thể thấy được nhóm đối tượng trẻ là nhóm cần được quan tâm và giáo dục các biện pháp giáo dục và ngăn ngừa HPV. Trong đó, các phương pháp phòng ngừa hiệu quả là chủng ngừa HPV và sàng lọc bằng tế bào học đã được chứng minh là có hiệu quả trong việc giảm tỷ lệ mắc mới của ung thư cổ tử cung [69, 118, 165, 169] và đã dẫn đến sự sụt giảm rõ rệt về mụn cóc sinh dục ở một số cơ sở được tiêm phòng sớm. Tuy nhiên, khi các nguồn lực không được phân bổ công bằng, nguy cơ ung thư cổ tử cung vẫn cao ở nhiều nước đang phát triển như Việt Nam do không có các chương trình tiêm phòng HPV định kỳ và sàng lọc cổ tử cung [65, 160]. Hầu hết các quốc gia này đều bị thách thức với những hạn chế về tài chính và hậu cần: ví dụ, sự sẵn có của cơ sở hạ tầng chăm sóc sức khỏe để thực hiện xác định những biến đổi ở cổ tử cung.

Tình trạng lưu hành các týp nguy cơ cao phổ biến hơn các týp nguy cơ thấp, kết quả này giống với một số nghiên cứu tại Việt Nam cũng như thế giới, điều này có thể lý giải do những týp nguy cơ cao thường khó bị loại bỏ khỏi cơ thể và tồn tại dai dẳng hơn hẳn so với các týp nguy cơ thấp [25, 54, 76]. Trong tổng số ca mắc HPV, tỷ lệ nhiễm týp HPV52 (20,02%) là cao nhất, tiếp theo là HPV66 và HPV68 (14,8%) và HPV39 (12,8%). Kết quả nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu sử dụng kỹ

thuật xét nghiệm PCR của Halimatou Diop-Ndiaye trên đối tượng PNBD tại Cộng hoà Xê-nê-gan [59]. Kết quả này có sự khác biệt so với nghiên cứu của Hoàng Thị Thanh Huyền xác định sự phân bố tít HPV bằng phương pháp DNA micorarray với môi GP5+/GP6+ trên đối tượng PNBD ở Hải Phòng cũng chỉ ra tít HPV52 chiếm tỷ lệ cao nhất, tuy nhiên đứng thứ hai là tít HPV16 sau đó là HPV66 và HPV68 [3]. Sự khác biệt này về sự phân bố genotít HPV trên cùng một khu vực địa lý có thể do việc sử dụng các phương pháp xét nghiệm định tít khác nhau. Trong nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm HPV ở PNBD trên toàn cầu năm 2013 lại chỉ ra chiếm tỷ lệ cao nhất là tít HPV16 (38,9%), tiếp theo là tít HPV52 chiếm 32,7%, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng tỷ lệ nhiễm các tít HPV52, HPV66, HPV68 ở các nước châu Á và châu Phi cao hơn các nước châu Âu, châu Mỹ [146]. Như vậy, có thể thấy có sự khác biệt về sự phân bố tít HPV giữa các vùng địa lý, văn hóa, và giữa các đối tượng khác nhau.

Mặc dù tỷ lệ đa nhiễm các tít HPV được báo cáo khá phổ biến trong các nghiên cứu, một số nghiên cứu khác cho rằng tỷ lệ đa nhiễm các tít HPV này có thể không đại diện cho sự phổ biến và đặc điểm dịch tễ học của nhiều kiểu tít HPV trong cộng đồng. Hầu hết các nghiên cứu đã được thực hiện trên số lượng bệnh nhân không lớn, các bệnh nhân này thường là nhóm đối tượng nguy cơ cao và đến khám khi có các tình trạng bệnh lý hoặc đã được chẩn đoán UTCTC. Một số nghiên cứu có thể sử dụng các phương pháp xét nghiệm sàng lọc nội bộ, chưa được khuyến nghị bởi WHO, Phản ứng chéo trong xét nghiệm là một trong những hạn chế của các xét nghiệm đa nguyên nhân (multiplex PCR) [3, 127].

Trong nghiên cứu này, kết quả sàng lọc nhiễm HPV cho thấy nguy cơ nhiễm HPV không chỉ ở nhóm có hành vi nguy cơ cao trong QHTD mà còn ở những nhóm tuổi trẻ, chưa có QHTD. Từ đó, vai trò của các phương pháp phòng bệnh đặc hiệu, sớm là cần thiết, trong đó có tiêm phòng vắc xin. Tại Việt Nam, dữ liệu về tỷ lệ nhiễm HPV chưa được thu thập thông qua chương trình giám sát thường xuyên và thông tin về tỷ lệ mắc các bệnh liên quan tới HPV cũng chưa được thu thập một cách hệ thống. Vì vậy, mức độ hiểu biết về các kiểu lây truyền và tỷ lệ lây truyền HPV trong các nhóm quần thể khác nhau cũng như nhận thức về sự cần thiết của các chương trình y

tế công cộng để ngăn ngừa HPV ở Việt Nam còn rất hạn chế. Đồng thời, Việt Nam có rất ít nguồn lực để đưa vắc xin HPV vào Chương trình TCMR mặc dù các vắc xin HPV đã được cấp phép và đưa vào sử dụng trên thị trường từ năm 2007. Bên cạnh đó, đối tượng tiêm và lứa tuổi tiêm còn bị giới hạn. Đây cũng là một số các nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ tiêm phòng vắc xin HPV ở các nhóm nguy cơ cao hiện còn thấp [153, 156]. Mặt khác tỷ lệ nhiễm các týp HPV nguy cơ còn thấp tại cả 3 đối tượng MSM, PNBD và sinh viên (<10%) nên biện pháp tích cực để dự phòng UTCTC là cần thiết nhưng cần các chiến lược phù hợp để tăng cường tính sẵn sàng tự chi trả của cộng đồng đối với vắc xin.

Nhìn chung do đặc điểm nhân học của các nhóm đối tượng tham gia nghiên cứu có sự khác nhau tại các điểm nghiên cứu và phương pháp lựa chọn đối tượng tham gia nghiên cứu nên sẽ khó có thể thực hiện phân tích các đặc điểm nhân khẩu học đồng nhất trên cả 3 nhóm đối tượng. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu cho thấy độ tuổi trong các nhóm đối tượng nguy cơ cao thì MSM chiếm đa số là 16-35 tuổi. Nhóm này có độ tuổi trẻ hơn so với nhóm PNBD từ 30-39 tuổi. Độ tuổi trẻ hơn chiếm đa số trong nhóm MSM có tỷ lệ nhiễm HPV chiếm 29,8% cao nhất trong các nhóm đối tượng. Ngoài ra nhóm MSM có tỷ lệ đối tượng chưa kết hôn là 90,1% so với PNBD thì tỷ lệ kết hôn hoặc đã ly hôn chiếm 84%. Vì vậy lứa tuổi trẻ và độc thân chiếm đa số tại nhóm MSM có liên quan đến tỷ lệ nhiễm cao hơn trên nhóm đối tượng này. Về tình trạng sống của các nhóm đối tượng chưa thể hiện rõ mối liên quan đến tỷ lệ nhiễm HPV khi sống một mình hay sống cùng người khác. Kết quả phân tích về trình độ học vấn trong nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ nghịch với tỷ lệ nhiễm HPV ở trên các nhóm đối tượng. Cụ thể là nhóm MSM và PNBD có tỷ lệ đối tượng chủ yếu có trình độ học vấn dưới THPT trở xuống chiếm trên 50% và cho thấy tỷ lệ nhiễm cao nhất. Do vậy, có thể thấy đặc điểm nhân khẩu học về tuổi và trình độ học vấn cũng là một trong số các yếu tố có khả năng dẫn đến sự ra tăng nguy cơ nhiễm HPV trên các nhóm đối tượng nói riêng và trong cộng đồng nói chung.

4.1.2 Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của HPV trên một số nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018

Trong nghiên cứu này, toàn bộ 134 trình tự gen L1 (59 mẫu), E6 và E7 (75 mẫu) cho 14 týp HPV nguy cơ cao được sử dụng để phân tích đặc điểm phân tử các vùng gen của các chủng HPV được thu thập từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng của các nhóm đối tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên của Việt Nam, 2017-2018 so với các chủng HPV trên thế giới và chủng gốc.

4.1.2.1 Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền các týp HPV dưới chi alpha 7

Các týp HPV thuộc dưới chi alpha 7 (HPV18, 39, 45, 59, 68, 70, 85 và 97) là một trong 2 nhóm HPV quan trọng có khả năng gây ung thư ở người. Mỗi týp có lịch sử tiến hoá rất khác nhau, dẫn đến mức độ đa dạng khác nhau (ví dụ, 1,1% đối với HPV39 và 6,7% đối với HPV68) và đa dạng cả theo phân bố địa lý của các dòng và dưới dòng.

a. Đặc điểm phân tử và dạng di truyền của HPV18

Gen L1 và E6-E7 được phân tích tương ứng trên 4 và 9 chủng HPV18. Dựa vào 2 đoạn gen này, các chủng HPV18 trong nghiên cứu này đều thuộc dưới dòng A1, gần gũi nhất với các chủng tìm thấy ở Nhật Bản, Thái Lan và Costa Rica. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu về các biến thể của HPV18 trong khu vực châu Á và trên toàn thế giới [33, 178]. Một nghiên cứu về các biến thể của HPV18 ở Hoa Kỳ chỉ ra rằng người nhiễm các biến thể của châu Âu (dưới dòng A3 đến A5) và châu Mỹ gốc Á (dưới dòng A1/A2) có nguy cơ phát triển CIN3 và UTCTC cao hơn so với nhiễm biến thể của châu Phi (dòng B/C). Hơn nữa, tỷ lệ các ca UTCTC do nhiễm biến thể A1 cao hơn so với các biến thể A2-A5 [33, 177].

Khi phân tích đa dạng trình tự các mẫu phân lập ở Việt Nam so với trình tự gốc, tỷ lệ khác biệt của vùng gen L1 cao hơn so với vùng gen E6-E7. Một nghiên cứu ở Nhật Bản khi so sánh đa dạng di truyền trên toàn bộ hệ gen cũng cho kết quả vùng gen E7 là vùng trình tự bảo thủ nhất. Đồng thời nghiên cứu ghi nhận một số thay thế

nucleotit A182C và A548G (tương ứng với thay thế axit amin Q26H và N129K) ở khung đọc mở E6 và thay thế G659T, G704A, G747A (tương ứng với thay thế axit amin D24Y, D39N, và R53Q). Các trình tự E6-E7 ở Việt Nam bảo thủ hơn khi không ghi nhận thay thế nucleotit nào dẫn đến sự biến đổi axit amin. Điều này có thể được lý giải bởi trình tự E6, đặc biệt là E7 đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển UTCTC.

Biến đổi 33 axit amin trên tổng số 330 axit amin của vùng L1, tương đương 31 biến thể duy nhất. Trong số này 10 biến đổi trên trình tự aa xuất hiện ở vùng kháng nguyên quan trọng immune-dominant loops. Cụ thể, đột biến H76Y ở BC loop, và đột biến A139E, T176N và N177T ở DE loop, H202D và Q214H ở EF loop, còn đột biến A287T, P293S, T294S và Q314R ở FG loop.

Khi so sánh với trình tự gốc AY262282 (A1), có 15 axit amin biến đổi trên tổng số 441 axit amin của HPV-18 L1 protein. Mặc dù ko phát hiện được chèn gen hoặc mất gen, có 4/15 vị trí thay đổi aa trong vùng immune-dominant loops. Cụ thể đột biến R112K ở BC loop, trong khi đó đột biến Q334P, I338L và R344P tìm thấy ở FG loop.

b. Đặc điểm phân tử và dạng di truyền của HPV39

HPV39 chia thành 2 dòng A và B. Dòng A chia nhỏ thành A1 và A2 (khác nhau $0,48 \pm 0,06\%$ về trình tự nucleotit); và 2 dưới dòng này khác biệt với dòng B tương đương nhau, với sự khác biệt trung bình tương ứng là $0,98 \pm 0,09\%$ và $0,97 \pm 0,08\%$. Tất cả HPV39 phân lập từ Costa Rica được xếp vào dưới dòng A1 (67%, 70/105) hoặc A2 (33%, 35/105); trong khi đó, chỉ một số ít mẫu từ Đài Loan thuộc dưới dòng A2 (2/4) hoặc B (2/4), các mẫu của Rwanda được xếp vào dưới dòng A (7/8 chủng) hoặc B (1/8 chủng) nhưng tất cả 5 mẫu từ Burkina Faso được phân loại vào dòng B [39].

Trong nghiên cứu này, tất cả 4 mẫu của Việt Nam đều thuộc dưới dòng A2, có trình tự gần gũi với các chủng của Đài Loan. Trình tự gen xuất hiện 2 thay thế nucleotit dẫn tới biến đổi axit amin ở vị trí T558C (L151P) trên vùng gen E6 và

C853G (Q88E) trên vùng gen E7. Biến đổi L151P trên vùng gen E6 dẫn đến thay đổi cấu trúc từ xoắn alpha sang gấp khúc ngẫu nhiên, vì vậy biến đổi này có thể ảnh hưởng tới cấu trúc bậc 2 của vùng xung quanh vị trí biến đổi. Trong khi đó, Q88E trên vùng gen E7 không làm thay đổi vùng cấu trúc xoắn alpha, do vậy cấu trúc bậc hai của protein E7 của các chủng phân lập ở Việt Nam hoàn toàn tương đồng với protein E7 của trình tự gốc [75]. Trên vùng gen L1, mặc dù một số thay thế axit nucleic được ghi nhận, tuy nhiên không có thay thế nào dẫn tới biến đổi axit amin. Do vậy, cấu trúc protein L1 được bảo tồn trên các chủng HPV39 phân lập ở Việt Nam.

c. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV45

HPV45 được chia thành 2 dòng lớn A và B, trong đó dòng A chia thành 3 dưới dòng từ A1 đến A3 và dòng B chia thành 2 dưới dòng B1 và B2. Phân bố các dưới dòng của HPV45 bị ảnh hưởng chủ yếu bởi vị trí địa lý. Dưới dòng A1 chủ yếu được tìm thấy ở châu Phi với tỷ lệ trên 60% và hiếm gặp ở các vùng địa lý khác. Dưới dòng A2 phổ biến nhất ở châu Á–châu Đại Dương và Bắc Mỹ, và B1 phổ biến ở châu Âu. Trong khi dưới dòng A3 rất hiếm gặp và chỉ được tìm thấy ở châu Phi và Nam Mỹ thì dưới dòng B2 lại được ghi nhận ở toàn bộ các vùng địa lý với tỷ lệ dưới 40% [35].

Số lượng mẫu HPV45 được phân lập ở Việt Nam rất hạn chế, và được phân loại vào nhóm dưới dòng B2. Biến thể phân lập ở Việt Nam có ghi nhận 4 thay thế axit nucleic không dẫn đến biến đổi axit amin: A134T, T341C, T482C và A497G và 4 thay thế axit nucleic có biến đổi axit amin: A124C (K8T), C157T (T19I), G259T (C53F) và T313C (F71S) trên vùng gen E6. Trong đó hầu như tất cả các thay thế này đều đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đó [35, 42]. Chỉ có thay thế T313C dẫn đến thay thế axit amin F sang S ở vị trí 71 là biến đổi mới được ghi nhận ở nghiên cứu này trên mẫu phân lập tại Việt Nam.

d. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV59

HPV59 chia thành 2 dòng lớn A và B, trong đó dòng A chia thành 3 dưới dòng A1, A2 và A3. Những chủng thuộc dòng A đa dạng hơn dòng B với khác biệt trung

bình 0,60%-0,89%, HPV59 dòng A và B có khác biệt trung bình 1,11%-1,2 [134, 175].

Khi phân tích trình tự vùng gen E6, có một vùng gen dài 9 nucleotit (AGTGAAACT) chèn vào sau vị trí nucleotit 519 và 9 base này dịch mã thành 3 axit amin SET. Điểm chèn thêm trình tự này được ghi nhận ở trình tự gốc, một số chủng phân lập ở Trung Quốc và Luxemburg (X77858, LR861866, LR862025, LR861875). Theo nghiên cứu tại Trung Quốc, các trình tự này được chia thành một dưới dòng, gọi là B1-2. Cũng trong nghiên cứu này, gen E7 được chỉ ra có ít các biến đổi dẫn đến thay thế axit amin ở các trường hợp HSIL so với tổn thương tế bào biểu mô vảy mức độ thấp (low grade squamous intraepithelial lesion – LSIL) và viêm cổ tử cung [188].

d. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV68

Trong các nghiên cứu trước đây, hai dòng phân lập đặc trưng của HPV68 (HPV68Ref (R)/HPV68a và ME180/HPV68b) có chung 93% trình tự nucleotit trong ORF L1, và được chỉ định là phân nhóm [96, 133]. Một nghiên cứu giải trình tự các vùng URR và E6 của 80 mẫu dương tính với HPV68 từ các bệnh nhân ở Costa Rica, Đài Loan, Rwanda và Burkina Faso, đã xác định được 20 chủng (22,7%) liên quan đến HPV68R, và 68 chủng (77,3%) liên quan đến ME180. Các bộ gen liên quan đến ME180 được đặt tên và chia thành các dòng C, D, E và F của HPV68 và các dòng phân lập liên quan đến HPV68R được đặt tên và chia thành các dòng A và B.

Các dòng A/B của HPV68 được phân tách xa khỏi các dòng C/D/E/F; tất cả biến thể được sắp xếp thành hai nhóm riêng biệt và hiển thị sự khác biệt trung bình từ 6,38-6,61% trên các bộ gen hoàn chỉnh. So sánh sự đa dạng nội bộ của biến thể trong các nhóm A/B và C/D/E/F cho thấy sự khác biệt tương ứng là 0,93-0,97% và 1,20-1,72%. Do đó, biến thể liên quan đến ME180 thay đổi nhiều hơn so với các phân lập liên quan đến HPV68R, phù hợp với phân tích phát sinh chủng loại chỉ ra rằng hai dòng liên quan đến HPV68R và bốn dòng liên quan đến ME180 tạo thành HPV68. Các dòng tiếp tục phân loại thành các dưới dòng: A1 và A2, C1 và C2, D1 và D2, và

F1 và F2. Các dòng phân lập từ Burkina Faso được chia vào các dòng D2 (1/6), E (2/6) và F (3/6); các phân lập từ Rwanda được chia vào A1 (2/14), B (1/14), C1 (7/14), E (1/14) và F (3/14); và cả 4 chủng phân lập từ Đài Loan được sắp xếp vào C2 [39]. Nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả tương đồng với nghiên cứu này khi phần lớn các chủng phân lập từ Việt Nam (7/8 chủng – 87,5 %) thuộc dòng C2, giống với Đài Loan; chủng còn lại (1/8 chủng – 12,5%) thuộc dòng E, giống với Trung Quốc.

Ngoài các dòng đang lưu hành tại Việt Nam, nghiên cứu này cho một dữ liệu ban đầu về các vị trí đa hình nucleotit, đặc biệt đối với protein E6, protein tương tác với protein E3 ubiquitin ligase và do đó tạo phức hợp với protein ức chế khối u p53, và protein E7, protein tương tác trực tiếp với protein Rb ức chế khối u [181]. Đối với protein E6, một số biến đổi axit amin nằm ở vị trí hình thành xoắn alpha (N100D, T122N và I152T), nếp gấp beta (C53N và F62L). Đối với protein E7, có 5 thay đổi axit amin liên quan đến vị trí xoắn alpha (L52Q, D85E, T89K, Q92L và T107R) và 3 thay đổi liên quan vị trí nếp gấp beta (R64T, L68V/T và A75P/L). C175 và C429 hình thành cầu nối disulfide S-S là hai vị trí quan trọng trong cấu trúc bậc 2 của protein L1, tuy nhiên không quan sát thấy có sự biến đổi nucleotit cũng như axit amin ở các vị trí này trong nghiên cứu. Hai vị trí biến đổi axit amin Y18C và Q22E nằm trong vị trí tương tác giữa protein E7 và Rb1. Do vậy biến đổi này có thể gây ảnh hưởng tới liên kết giữa hai protein, kết quả trong khả năng biến đổi gây ung thư của biến thể.

4.1.2.2 Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền các týp HPV dưới chi alpha 9

a. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV16

Vì HPV16 là týp HPV gây bệnh và là týp quan trọng nhất về mặt y học, đặc điểm di truyền của các biến thể HPV16 đã được phân tích nhiều trong các nghiên cứu trước đây. Trong nghiên cứu này dựa vào đoạn gen L1, các chủng HPV16 trong nghiên cứu được phân lập từ các mẫu dương tính trên đối tượng MSM, PNBD, nFSW và nữ sinh viên được phân loại thành dưới dòng A3 (European) và A4 (East Asian).

Các phân tích phát sinh loài trước đây của các biến thể HPV16 được chia thành 4 dòng chính: Châu Âu (E), Châu Mỹ gốc Á (AA), Châu Phi-1 (Af-1) và Châu Phi-2 (Af-2) [41, 81, 183]. Quan sát nổi bật nhất về các biến thể của HPV16 là sự hiện diện không đồng nhất về di truyền trong những dòng dõi “không phải châu Âu” (tức là các dòng B/C/D), điều này trái ngược với sự đồng nhất tương đối của dòng A (châu Âu). Ngoài sự khác biệt giữa các dòng biến thể chính, cấu trúc dưới dòng cũng thể hiện một sự phát triển tốt trong dòng D (AA). Sơ đồ cây thể hiện sự hỗ trợ tốt cho vị trí của tất cả các dòng và dưới dòng đã được đặt tên. Dưới dòng miêu tả các nhóm trình tự bộ gen với sự khác biệt 0,5–1,0% giữa các bộ gen của chúng khi tập hợp trong cây phát sinh loài [38]. Tóm lại, các phân tích này cho thấy sự hiện diện của các dưới dòng nhất định về mặt tiến hóa ở cấp độ phân loại sâu hơn so với 4 nhóm biến thể thường được công nhận (tức là E, Af-1, Af-2 và AA; được đổi tên lần lượt là A, B, C và D) [41]. Đáng chú ý là việc không thể phân biệt rõ ràng khi chỉ so sánh trình tự nucleotit L1 giữa các dòng và dưới dòng. Quan sát này đưa ra một ví dụ cụ thể về việc sử dụng bộ gen HPV hoàn chỉnh để xác định các đơn vị phân loại biến thể dòng và dưới dòng, trong khi trình tự L1 ORF là đủ và đáng tin cậy để phân biệt các týp HPV [18].

b. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV31

Các chủng HPV31 được phân loại thành 3 dòng: A, B và C, với prototype quy ước là dòng A. Mẫu phân lập ở Việt Nam dựa trên vùng gen E6-E7 và L1 đều cho kết quả thuộc dòng A, gần nhất với trình tự phân lập tại Thái Lan và Costa Rica. Một số nghiên cứu ở Trung Quốc và Serbia cũng cho thấy dòng A và C là hai dòng phổ biến nhất, trong khi dòng B rất hiếm gặp [90, 185]. Nghiên cứu của IARC chỉ ra dưới dòng A2 và C2 là hai dòng phổ biến ở phụ nữ châu Á, trong khi dưới dòng A1 và B1 phổ biến ở phụ nữ Mỹ la tinh. Phân tích tỷ lệ các mẫu CIN3+ với phân loại trình tự HPV31 cho thấy dưới dòng A1, A2 và B2 có liên quan tới CIN3+ cao gấp 2,5 lần so với dưới dòng C3.

Vùng E6 không xuất hiện biến đổi nào, trong khi đó vùng gen E7 có 2 biến

đổi nucleotit và đều dẫn đến thay thế axit amin: C626T (H23Y) và A743G (K62E). Vùng L1 có 2 biến đổi nucleotit, tuy nhiên cả 2 biến đổi này không dẫn tới thay thế axit amin. Thay thế H23Y ở vùng gen E7 là vị trí biến đổi phổ biến ở mẫu phân lập dưới dòng A2 và B2 và có liên quan tới CIN3+. Axit amin ở vị trí 23 nằm trong vùng bảo thủ 2 (conserved region 2 domain), là vùng tương tác trực tiếp với protein Rb (pRb binding site). Do vậy, biến đổi axit amin ở vị trí này làm thay đổi ái lực giữa protein E7 và protein Rb. Điều này có thể là nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ nhóm bệnh nhân nhiễm HPV31 thuộc dòng A2 và B2 phát triển CIN3+ cao hơn so với nhóm nhiễm chủng thuộc các dòng/dưới dòng khác và nhóm đối chứng [126].

c. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV33

Một nghiên cứu trên trình tự vùng URR/E6 của 179 chủng và sử dụng để phân loại cây phát sinh chủng loại. Trình tự toàn hệ gen của các chủng đặc trưng cho thấy có 2,4% (186 vị trí trong tổng số 7912 nt) và 3,0% (69 vị trí trong tổng số 2284 aa) có biến đổi. Phân loại dựa trên cây phả hệ cho thấy 2 dòng rõ rệt A và B. Riêng dòng A khá đa dạng và chia thành A1 và A2, với khác nhau giữa dưới dòng $0,6\% \pm 0,07\%$. Dưới dòng A1 và A2 đều khác biệt với B ($0,9\% \pm 0,09\%$ khác biệt về trình tự axit amin) [38].

Tất cả các trình tự phân lập tại Việt Nam đều thuộc dòng A, dưới dòng A1. Đây cũng là dòng phổ biến nhất và xuất hiện ở tất cả các vùng địa lý và dân tộc trên thế giới [34]. Phân tích trình tự E6-E7 và L1 chỉ có 1 biến đổi dẫn tới thay thế axit amin ở vị trí axit amin thứ 101 (I101T) thuộc vùng gen E6. Tuy nhiên biến đổi này không thuộc vùng trình tự quan trọng của E6 khi tương tác với Zinc, TP53, E6AP hay PDZ [171].

d. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV35

Các chủng HPV35 khá bảo thủ, chỉ có 0,6% khác biệt trong trình tự nucleotit giữa 2 chủng, đa dạng trong trình tự nucleotit giữa các chủng là 1,8% (140/7908) với 46/2306 (2%) trên trình tự axit amin [27, 28, 69].

Các chủng HPV35 được chia thành 2 nhánh chính, với sự khác biệt 0,5% $\pm 0,06\%$ khác biệt giữa các nhánh, tuy nhiên sự khác biệt này không đảm bảo để phân loại thành các dòng khác nhau, do vậy chỉ chia thành 2 dưới dòng A1 và A2, cho thấy HPV35 vừa mới chỉ tiến hoá từ chủng gốc của HPV31, HPV35 và HPV16 [38].

Vùng gen E6-E7 của HPV35 khá bảo thủ với 1 vị trí thay đổi nucleotit (T232C) có thay thế axit amin (W78R) ở vùng gen E6. Trong khi đó, vùng gen L1 có 3 vị trí mất đoạn, 7 vị trí thay thế nucleotit dẫn đến thay thế axit amin và 1 vị trí thay thế bộ 3 codon.

e. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV52

HPV52 là chủng phổ biến nhất ở quần thể phụ nữ châu Á cũng như ở Việt Nam. Về phân loại, HPV52 phân chia thành 4 dòng A, B, C, D trong đó A, B, C xếp vào 1 clade với 0,8-1,1% khác biệt về trình tự nucleotit giữa các dòng này, còn dòng D khác biệt 1,8-2,0% so với các dòng còn lại. Dòng C và D cách nhau khá xa (2,0% $\pm 0,14\%$), giống với sự khác biệt giữa dòng E và AA của HPV16 (1,9% $\pm 0,15\%$), và giống với sự khác biệt giữa dòng Af và non-Af của HPV18 (2,0% $\pm 0,15\%$) [37, 41]. Dòng B xuất hiện nhiều nhất, trong đó B2 chiếm tỷ lệ 15/19 mẫu phân tích. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra dòng B có mối liên quan trực tiếp tới nguy cơ phát triển các tổn thương tế bào ở mức độ cao [32, 143]. Vì vậy nguy cơ phát triển các biến đổi bất thường ở tế bào và UTCTC ở phụ nữ Việt Nam nhiễm HPV52 là rất cao.

Về đa dạng di truyền phân tử, vùng gen E6-E7 ở các mẫu phân lập tại Việt Nam có xuất hiện thay thế nucleotit A379G (K39R), biến đổi này đã được biết đến có liên quan tới các tổn thương tế bào ở mức độ cao [66]. Ngoài ra, biến đổi 623T (T20I), 760A (G63S) cũng có liên quan tới tân sinh cổ tử cung (cervical neoplasia) [30]. Trong khi đó, vùng gen L1 khá bảo tồn, chỉ có 1 biến đổi có thay thế axit amin ở vị trí T5578C (L5S) trong trình tự thuộc dưới dòng C2.

f. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV58

HPV58 chia thành 4 dòng A, B, C, D và 7 dưới dòng A1/A2/A3, B1/B2, D1/D2. Giữa các dòng, sự khác biệt trong trình tự nucleotit là 0,9-1,4%, trong khi đó

sự khác biệt giữa các dưới dòng như A1 và A2 là 0,5-0,7%. Dưới dòng B1 và B2 mặc dù không chụm lại trên cây phân biệt chủng loài, sự khác biệt giữa 2 dưới dòng là $0,7 \pm 0,07\%$, không nhiều so với sự khác biệt 1% giữa các dòng/dưới dòng khác. Tất cả các trình tự phân lập ở Việt Nam đều thuộc dòng A, trong đó xuất hiện cả 3 dưới dòng là A1, A2 và A3.

Vùng gen E6 của chủng HPV58 có 2 biến đổi C307T và A388C (K93N). Biến đổi C307T đã được báo cáo trên mẫu phân lập ở Trung Quốc, Braxin, và A388C đã từng được ghi nhận làm tăng nguy cơ phát triển HSIL. Bên cạnh đó, vùng gen E7 có 4 biến đổi G694A (G41R), T744G, G761A (G63D) và T803C (V77A). Vùng gen L1 có 6 thay đổi nucleotit không thay thế axit amin ở vị trí 6416, 6434, 6485, 6560, 6641 và 6944, và 3 thay đổi có thay thế axit amin ở vị trí 6014, 6539 và 6688. Hầu hết các biến đổi này đã được ghi nhận ở các chủng phân lập ở Trung Quốc, Nhật Bản [152, 188].

4.1.2.3 Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền các týp HPV dưới chi alpha khác

a. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV 51

HPV51 được chia thành 2 dòng lớn, A và B, và các dưới dòng A1-A4 và B1-B2. Khác biệt giữa các dòng và dưới dòng tương ứng là 0,52-0,74% và 0,92-1,24%, khác biệt trong cùng 1 dưới dòng là 0,2–0,03%. Các chủng HPV51 từ các nước châu Á thuộc dòng A, trong khi đó các chủng từ châu Phi phần lớn thuộc dòng B. Ở Costa Rica, cả dòng A và B đều được phát hiện. Dưới dòng B2 chỉ tìm thấy ở các nước châu Phi [40].

Các thay thế C395T (S100L) trên vùng gen E6 và C756T (S66L) trên vùng gen E7 là các thay thế phổ biến nhất trên trình tự tương ứng của HPV51. Vị trí axit amin S100L nằm trên vùng cấu trúc gấp nếp và không dẫn tới thay đổi cấu trúc bậc 2 của protein E6. Trong khi đó, S66L là thay thế axit amin có ảnh hưởng có lợi cho HPV51 thích nghi với môi trường. Bên cạnh đó, vị trí nucleotit 6335 nằm trên vùng cấu trúc lặp trên bề mặt hạt vi rút. Do vậy, biến đổi A6335C dẫn đến thay thế axit amin N272T trên vùng gen L1 của mẫu phân lập tại Việt Nam có thể ảnh hưởng tới

cấu trúc epitope của HPV51 [182].

b. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV56

Dựa vào trình tự gen L1, toàn bộ mẫu HPV56 phân lập đều thuộc dòng B. Tuy nhiên, khi sử dụng vùng gen E6-E7 để phân loại, có 2/5 trình tự được phân loại vào dòng A, dưới dòng A2 và 3/5 trình tự còn lại vẫn được phân loại thuộc dòng B. Điều này có thể lý giải do sự giao thoa về đột biến, một số chủng có các biến đổi đặc trưng ở các vùng gen khác nhau, dẫn đến sự khác nhau khi phân loại dựa vào các vùng gen khác nhau.

Các chủng HPV56 có mức độ đa dạng thấp. Tỷ lệ đa dạng trên trình tự nucleotit và axit amin của toàn hệ gen chỉ tương ứng là 1,7% (134/7922) và 2% (51/2520 axit amin). Có 2 dòng A và B và 2 dưới dòng A1 và A2 đã được mô tả cho HPV56. Tỷ lệ đa dạng giữa các dưới dòng và giữa dòng tương ứng là 0,55-0,05% và 0,87-0,1%, trong đó sự khác biệt về trình tự nucleotit giữa A2 và B lên đến 1%. Ở Costa Rica, HPV 56 thuộc A1, A2 và B, trong đó hơn 50% mẫu từ châu Á và châu Phi thuộc dưới dòng A2. Không có A1 trong các mẫu từ Rwanda và Burkina Faso [39].

Vùng gen E6 có 2 biến đổi thay thế axit amin là A141C (S14R) và A263C (K54N), đây là 2 biến đổi đã được ghi nhận ở Braxin [177]. Bên cạnh đó, vùng gen E7 có 2 điểm thay đổi thay thế axit amin là G605A (V12I) và G802C (Q77H) và vùng gen L1 có 2 đột biến A5867G (N126D) và A7020G (K510R). Các đột biến này cũng đã được ghi nhận ở các mẫu phân lập tại Trung Quốc [90]. Do vậy, các chủng HPV56 phân lập ở Việt Nam có nhiều tương đồng với các trình tự phân lập ở Trung Quốc. Trong đó, vị trí Q77H nằm trên đoạn trình tự nếp gấp beta của protein E7 và phân tích cấu trúc sử dụng phần mềm PolyPhen-2 cho rằng thay thế axit amin ở vị trí này có thể ảnh hưởng tới cấu trúc của protein E7 cũng như chức năng của protein này [77].

c. Đặc điểm phân tử và đa dạng di truyền của HPV66

Các chủng HPV66 chia thành 2 dòng A và B và 2 dưới dòng B1 và B2. Khoảng cách giữa các dòng và dưới dòng tương ứng là 1,55-0,13% và 0,53-0,06%, Các mẫu HPV66 từ Costa Rica thuộc lineage A và B [40]. Tất cả các mẫu phân lập ở Việt Nam đều thuộc dòng B, chia thành dưới dòng B1 và B2 dựa trên vùng trình tự E6-E7.

Vùng gen E6, E7 có lần lượt 2 và 5 biến đổi trên trình tự axit amin: T108C (S3P), A378G (S93G) và T585C (V5A), G602A (V11I), A741C (K57T), C755T (H61Y) và T881G (S104A). Trong đó, vùng gen L1 có 6 vị trí biến đổi nucleotit dẫn đến thay đổi axit amin: G6049A (G135S), A6061A (I139L), T6062C (I139T), GT6182-6183TC (G179V), T6278A (L211Q), G7103A (R486K) và 1 mất đoạn 9 nucleotit ở vị trí 7059 (CCCTAGACC). Đa phần các thay đổi này đều được ghi nhận trong một nghiên cứu trên mẫu thu thập ở Chile. Nghiên cứu này cũng chỉ ra mất đoạn 9 nucleotit tương ứng 3 axit amin không làm thay đổi khung đọc mở của protein L1. Tuy nhiên mất đoạn này làm giảm tính chất ưa nước, cũng như tính kháng nguyên của protein L1 [16].

4.2 Phát triển bộ mẫu chuẩn nhằm đánh giá sinh phẩm chẩn đoán Realtime-PCR cho 14 týp HPV nguy cơ cao

Hiện nay, không có phương pháp điều trị đặc hiệu khi bị nhiễm HPV do đó, việc chủng ngừa và phát hiện sớm nhiễm HPV sẽ giúp cho bệnh nhân ngăn ngừa và điều trị. Các phương pháp được sử dụng để sàng lọc HPV bao gồm xét nghiệm tế bào học và chẩn đoán bằng sinh học phân tử, trong đó phương pháp chẩn đoán HPV ADN được đánh giá có độ nhạy và đặc hiệu cao trên 95% [82, 140, 174]. Các sinh phẩm chẩn đoán HPV có hơn 250 loại sinh phẩm được thương mại hóa nhưng 82% các xét nghiệm đã công bố vẫn còn thiếu các đánh giá phân tích hoặc lâm sàng do chưa có các bộ panel chuẩn HPV- ADN phù hợp [168]. Hiện tại ở Việt Nam, một số sinh phẩm chẩn đoán HPV được đăng ký sử dụng để chẩn đoán bao gồm bộ sinh phẩm khuếch đại phát hiện HPV Cobas 4800 (Roche, Hoa Kỳ), bộ sinh phẩm khuếch đại HPV nguy cơ cao RealTime (Abbott, Đức), HPV Genotypes 14 Real™ Quant

(Sacace, Ý), bộ định kiểu gen AccuPower HPV (Bioneer, Hàn Quốc) và RealLine HPV16/18 (Bioron, Đức) [12, 81, 128]. Do đó, phát triển các bộ mẫu chuẩn để có thể đánh giá được các chỉ số chất lượng của các bộ sinh phẩm thật sự cần thiết. Chính vì vậy, nghiên cứu này đã phát triển các bộ mẫu chuẩn HPV để xác định các chỉ số kỹ thuật bao gồm độ nhạy lâm sàng và phân tích, độ đặc hiệu và độ chính xác của các sinh phẩm chẩn đoán HPV nguy cơ cao bằng phương pháp realtime-PCR [104, 168].

Xây dựng bộ mẫu chuẩn là thước đo quan trọng nhằm đánh giá chất lượng của các xét nghiệm/sinh phẩm chẩn đoán sử dụng trong xét nghiệm sàng lọc, chẩn đoán bệnh như các xét nghiệm HPV bằng kỹ thuật sinh học phân tử... Có nhiều tiêu chí khác nhau để đánh giá chất lượng một bộ sinh phẩm xét nghiệm, đặc biệt là độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chính xác. Trong quá trình xây dựng bộ mẫu chuẩn, tính các đặc tính của bộ mẫu chuẩn cần được đánh giá các chỉ số kỹ thuật dựa trên các phương pháp xét nghiệm tiêu chuẩn hoặc sinh phẩm chẩn đoán đã được lưu hành.

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO) và Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) việc thiết lập các bộ chuẩn sinh học giúp cho các quy trình xét nghiệm được thực hiện đồng bộ và cung cấp cơ sở nhất quán khi so sánh kết quả đánh giá của mỗi thử nghiệm được thực hiện đồng thời ở trong cùng phòng thí nghiệm hoặc giữa các phòng thí nghiệm. Bên cạnh việc sử dụng mẫu chuẩn quốc tế, việc xây dựng các bộ mẫu chuẩn có thể được thực hiện bởi các cơ quan quản lý quốc gia, các tổ chức và cơ sở nghiên cứu. Tùy từng mục đích và phương pháp nghiên cứu khác nhau các bộ mẫu chuẩn sẽ được xây dựng theo đặc tính mẫu và phương pháp nghiên cứu. Hiện tại, trên thế giới những hướng dẫn và nghiên cứu đầy đủ về việc xây dựng và thiết lập bộ mẫu chuẩn chẩn đoán HPV bằng kỹ thuật sinh học phân tử còn rất hạn chế do các vi rút này không nuôi cấy được trong phòng thí nghiệm mà chủ yếu các mẫu chuẩn được công bố chủ yếu được thiết lập bằng công nghệ vectơ tái tổ hợp [64, 165, 186].

Carina Eklund và cộng sự đã xây dựng và đánh giá đặc tính của bộ panel mẫu chuẩn HPV. Các bộ gen hoàn chỉnh của HPV được nhân bản bằng plasmid được các phòng thí nghiệm cung cấp cho nghiên cứu gồm HPV týp 6, 11, 16, 18, 45 33, 39,

66, 68, 51, 31, 35, 56, 52, 58 và 59. Trình tự axit nucleic cho mỗi bộ gen HPV đã được xác lập và có sẵn trong ngân hàng gen. Trong đó, HPV11 và HPV58 ban đầu được nhân bản trong gen L1 sẽ được nhân bản trên vector (pGEM4z) được xác định tại gen L2 (vị trí 4781) và E1 (vị trí 1158). Đối với HPV35 bao gồm: HPV35-S, chứa tất cả các gen từ L1 đến E7, bao gồm các nucleotit 5012 đến 956, và HPV35-L, bao gồm cả nucleotit 956 đến 5012. Plasmid được sử dụng cho HPV68 chỉ chứa gen L1. ADN của từng bộ gen HPV riêng lẻ được tạo ra bằng cách nuôi cấy qua đêm *Escherichia coli* đã biến nạp và tinh chế plasmid và xác định mật độ quang học được thực hiện ở bước sóng 260 nm và 280 nm để ước tính độ tinh khiết của chế phẩm [61].

Bộ mẫu chuẩn được Rui Zang và cộng sự (2012) thực hiện và sử dụng để sàng lọc và định danh các týp HPV. Bộ mẫu chuẩn được xây dựng và đánh giá độ nhạy trên 9 týp HPV trong các mẫu thử đơn týp và đa týp. Các plasmid của HPV týp 11 (ATCC số 45151D), 16 (ATCC Số 45113), 18 (ATCC số 45152) và 52 (ATCC số VRMC-29TM) được cung cấp từ American Type Culture Collection (Manassas, Va., Hoa Kỳ). Bộ gen hoàn chỉnh của các týp HPV khác được khuếch đại bằng plasmid từ các mẫu bệnh phẩm và được cung cấp từ các phòng xét nghiệm của công ty Genetel Pharmaceuticals (Thâm Quyển, Trung Quốc) (HPV týp 6 và 31) và viện Genomics Bắc Kinh (HPV týp 33, 39 và 51). Bộ gen của HPV có kích thước khoảng 7,9 kb được nhân bản thành các vector khác nhau, bao gồm: HPV 6 trong pUC 19 ở vị trí 7712, HPV 31 trong PUC 19 ở vị trí 7756, HPV 33 trong PBR322 ở vị trí 7881, HPV 39 trong PBR322 tại vị trí 7842 và HPV 51 trong pBR322 ở vị trí 7557. Bộ gen của HPV được giải trình tự gen và tham chiếu với trình tự bộ gen chuẩn của HPV từ GenBank [168].

Tuy nhiên 5 bộ mẫu panel chuẩn trên đều được xây dựng từ những mẫu chuẩn plasmid bằng công nghệ tái tổ hợp toàn bộ hoặc một phần của hệ gen của vi rút HPV. Hạn chế của những nghiên cứu trên là mới thiết lập các bộ mẫu trong phòng thí nghiệm và chưa có những bộ mẫu trên lâm sàng được thiết lập kèm theo.

Ngoài bộ mẫu chuẩn được tạo ra từ plasmid tái tổ hợp như các bộ mẫu panel chuẩn từ các nghiên cứu được công bố, trong nghiên cứu này chúng tôi còn xây dựng được bộ mẫu chuẩn lâm sàng từ các mẫu bệnh phẩm lâm sàng từ người Việt Nam trên 2 thành phố Hà Nội và Hồ Chí Minh theo khuyến cáo của WHO. Bên cạnh đó, nghiên cứu còn thiết lập thêm bộ mẫu lâm sàng giả định từ plasmid pha trên nền mẫu bệnh phẩm lâm sàng để xác định độ chính xác (độ lặp lại, độ tái lặp) khi sử dụng để đánh giá sinh phẩm. Tuy nhiên, hạn chế trong bộ mẫu chuẩn này của chúng tôi là các mẫu được tạo ra từ plasmid tái tổ hợp chỉ mang một phần của hệ gen vi rút HPV.

Bộ mẫu panel chuẩn được xây dựng để đánh giá độ nhạy phân tích (giới hạn phát hiện) bao gồm 20 mẫu chuẩn cho 14 týp HPV plasmid bao gồm HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 và 68. Các mẫu chuẩn này được xây dựng trên nguyên tắc các đoạn gen đặc trưng E6-E7 hoặc L1 cho 14 týp HPV nguy cơ cao được nhân bản và chèn vào vectơ pGEM-T easy (Promega, Hoa Kỳ) tạo plasmid tái tổ hợp. Các plasmid này sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* TOP10. Các mẫu này sau khi xây dựng được xác định nồng độ gốc bằng phương pháp digital PCR trên dòng máy QX200 Biorad (máy tạo vi giọt Manual DG QX200, máy tạo vi giọt QX-200 (Biorad-Hồng Kông). Từ những mẫu chuẩn gốc thực hiện pha về các mẫu chuẩn làm việc có nồng độ làm việc khoảng 10^6 để bảo quản trong thời gian dài. Khi thực hiện các đánh giá chỉ số giới hạn phát hiện (LOD) mẫu chuẩn làm việc sẽ được pha loãng tiếp theo về các độ pha: 1, 5, 10, 50, 100 và 1000 bản sao/ μ l để tạo bộ mẫu chuẩn cho xác định độ nhạy phân tích,.

Bộ mẫu chuẩn sử dụng cho đánh giá độ chính xác được xây dựng chứa 4 đặc tính mẫu bao gồm mẫu âm tính, mẫu dương tính yếu, mẫu dương tính trung bình và mẫu dương tính cao với 14 týp HPV nguy cơ cao bao gồm 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 và 68. Bộ mẫu này được thiết lập từ bộ mẫu chuẩn HPV plasmid tái tổ hợp rồi tiến hành trộn trên nền mẫu lâm sàng âm tính để tạo ra 20 ống/mẫu (mẫu chuẩn lâm sàng giả định) cho 14 týp HPV nguy cơ cao. Các bộ mẫu chuẩn cho từng týp được pha về nồng độ phù hợp cho từng týp và sử dụng trong thiết kế đánh giá độ chính xác (độ lặp lại và độ tái lặp) trong các lần làm trong cùng một thời điểm

và giữa các lần làm vào các thời điểm khác nhau. Nồng độ của bộ mẫu chuẩn này có thể được điều chỉnh phù hợp với độ nhạy phân tích của bộ sinh phẩm được nghiên cứu đánh giá và thiết lập.

Ngoài ra, theo khuyến cáo của WHO, để đánh giá chất lượng các loại sinh phẩm chẩn đoán thì mỗi quốc gia, phòng thí nghiệm cần có bộ mẫu chuẩn lâm sàng. Bộ mẫu chuẩn này tốt nhất được xây dựng trên mẫu bệnh phẩm thu thập và được xác định trên chính cộng đồng dân cư nước sở tại (bao gồm mẫu HPV dương tính với các týp HPV và âm tính đang lưu hành tại nước sở tại) [132, 186]. Chính vì vậy, kết quả của việc thiết lập bộ mẫu lâm sàng trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng 5 bộ panel mẫu chuẩn, mỗi panel gồm 20 bộ mẫu bệnh phẩm lâm sàng từ 60 mẫu lâm sàng dương tính và 103 mẫu bệnh phẩm lâm sàng âm tính với 14 týp HPV nguy cơ cao trong đó có 103 mẫu bệnh phẩm lâm sàng âm tính với HPV. Bộ mẫu chuẩn này được xây dựng để đánh giá độ nhạy lâm sàng và độ đặc hiệu lâm sàng cho các bộ sinh phẩm chẩn đoán HPV bằng phương pháp Realtime-PCR và được khẳng định đặc tính mẫu và đánh giá tại phòng thí nghiệm của NIHE.

Các bộ mẫu chuẩn được xây dựng bao gồm 5 bộ panel mẫu chuẩn tạo ra 20 bộ/panel, trong đó có chứa bộ mẫu chuẩn lâm sàng từ mẫu bệnh phẩm người Việt Nam, mẫu chuẩn plasmid và mẫu chuẩn lâm sàng giả định. Toàn bộ các mẫu chuẩn trong các bộ mẫu chuẩn được thiết lập đều đã được khẳng định các đặc tính của mẫu để sử dụng trong nghiên cứu phát triển sinh phẩm chẩn đoán cũng như đánh giá chất lượng sinh phẩm chẩn đoán HPV bằng phương pháp Realtime-PCR. Các bộ mẫu chuẩn được nghiên cứu đánh giá tính ổn định trong 12 tháng theo điều kiện bảo quản tiêu chuẩn và thời gian thực bằng HPV Genotypes 14 Real™ Quant (Sacace, Ý) và Genoflow™ HPV (Diagcor, Hong Kong). Kết quả cho thấy, đặc tính chất lượng của các bộ mẫu chuẩn với mẫu bệnh phẩm lâm sàng đều không thay đổi về chỉ số chất lượng, tỷ lệ đồng nhất giữa các lần chạy là 100% và hệ số biến thiên giữa các lần đo nồng độ của các mẫu chuẩn plasmid tái tổ hợp là $Ct \leq 2$ trong điều kiện bảo quản -20°C. Tính ổn định của mẫu chuẩn tiếp tục được đánh giá theo thời gian thực và ghi nhận lại kết quả để phân tích trong thời gian tiếp theo.

4.3 Bàn luận những ưu điểm của đề tài

4.3.1 Chất lượng của nguyên vật liệu, hóa chất và sinh phẩm

Các nguyên vật liệu, hóa chất và sinh phẩm được sử dụng trong nghiên cứu đều đã được thương mại và cung cấp từ những nhà sản xuất/hãng có uy tín về chất lượng trên thế giới. Trong đó các vật liệu tiêu hao như đầu tít, ống tít 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5ml, 2ml và ống fancel 15 ml, 50 ml... đều được sử dụng từ hãng Eppendorf, Corning, SPL đạt tiêu chuẩn. Bên cạnh đó, các hóa chất như hóa chất tách chiết sử dụng Cador Pathogen 96 Qiacube HT (Qiagen, Hilden, Đức), môi của IDT, sinh phẩm HotStarTaq Plus Master Mix 2x (Qiagen, Hilden, Đức) cho phản ứng PCR và Genoflow™ HPV array test kit (Diagcor, Hồng Kông) và HPV Genotypes 14 Real™ Quant (Sacace, Como, Ý). Bên cạnh đó, BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher), NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit (Illumina) cho giải trình tự gen và vectơ pGEM-T easy (Promega, Hoa Kỳ), enzyme T4 ligase, tế bào *E. coli* TOP10... cũng được sử dụng. Như vậy, tất cả các nguyên vật liệu, hóa chất và sinh phẩm sử dụng đều được chuẩn hóa, thẩm định và xác nhận tại nhiều phòng thí nghiệm và trong đó có phòng thí nghiệm của phòng nghiên cứu phát triển vắc xin và sinh phẩm, Trung tâm nghiên cứu y sinh học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương nhằm hạn chế tối đa những sai số có thể mang lại do vật liệu, hóa chất và sinh phẩm gây ra.

4.3.2 Cơ sở hạ tầng, trang thiết bị, máy móc

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành trong điều kiện phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn và những trang thiết bị, máy móc sử dụng trong nghiên cứu đều của những hãng máy có chất lượng và uy tín trên thế giới. Tất cả những điều kiện phòng thí nghiệm, trang thiết bị, máy móc mới và được bảo dưỡng, hiệu chuẩn định kỳ hàng năm. Điều này đã hạn chế những sai số hệ thống có thể do thiết bị gây ra, đảm bảo kết quả thử nghiệm chính xác.

4.3.3 Quy trình thực hiện

Quy trình được sử dụng trong đề tài tuân thủ theo các quy trình chuẩn của dự án “Đặc điểm dịch tễ học, gánh nặng bệnh tật liên quan đến nhiễm HPV ở Việt Nam” của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã được Hội đồng đạo đức xét duyệt trong nước và quốc tế của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (NIHE), Việt Nam (số tham chiếu: IRB-VN01057-13/2017) và hội đồng y đức của Trường Vệ sinh và Y học Nhiệt đới London (số tham chiếu: 14207) đã được phê duyệt nghiên cứu này. Đây là một dự án lớn với sự tham gia của nhiều đơn vị bao gồm Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (NIHE), Viện Pasteur Tp. HCM, Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học Khoa học xã Hội Nhân Văn – Đại học Quốc gia Hà Nội, Đại Đại học Khoa học Tự Nhiên - Đại học Quốc gia Tp.HCM, Đại học Huế... Các quy trình sử dụng nghiên cứu đã được chuẩn hóa và công bố trên các tạp trí khoa học uy tín quốc tế. Ví dụ như quy trình chạy PCR sàng lọc sử dụng bộ mồi đặc hiệu cho HPV, các quy trình chuẩn đã được phóng thí nghiệm xây dựng và các bộ sinh phẩm đang được lưu hành khác nhau gồm có PCR, PCR và lai phân tử, Realtime PCR, giải trình tự gen...

4.3.4 Phân tích kết quả và sự phù hợp với mục tiêu nghiên cứu

Nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm HPV lần đầu tiên được tiến hành trên trên 3 nhóm đối tượng gồm MSM, PNBD và nữ sinh viên của Việt Nam, 2017-2018. Kết quả được báo cáo trong đề tài hoàn toàn đầy đủ và phù hợp với 2 mục tiêu được đưa ra của đề tài. Đây là nghiên cứu đặc điểm phân tử về HPV đầu tiên ở Việt Nam được tiến hành trên cả các nhóm đối tượng tượng MSM, PNBD và nữ sinh viên. Trình tự gen L1, E6-E7 trong nghiên cứu này đã được báo cáo đầy đủ và cung cấp thông tin về đa dạng di truyền của các chủng HPV phân lập tại Việt Nam. Dựa trên dữ liệu dịch tễ học phân tử của HPV và vai trò của các gen L1, E6, E7 trong đáp ứng miễn dịch đối với các vắc xin HPV, các nhà sản xuất có cơ sở khoa học nhằm cải tiến các chủng HPV sử dụng trong sản xuất vắc xin, giúp nâng cao hiệu quả của vắc xin trong phòng bệnh, đặc biệt ý nghĩa với quần thể người Việt Nam.

Song song với đó, phát triển, xây dựng và sản xuất mẫu chuẩn áp dụng trong đánh giá chất lượng sinh phẩm y tế là yêu cầu cấp thiết nhằm đảm bảo chất lượng của sinh phẩm trên thị trường, góp phần nâng cao chất lượng dịch vụ y tế. Các nghiên cứu dịch tễ học cho thấy, tỷ lệ nhiễm HPV ở các nhóm đối tượng có nguy cơ là khá phổ biến. Trong đó, có nhiều týp HPV có nguy cơ gây ra các vấn đề sức khỏe nghiêm trọng, như các bệnh ung thư, nếu không được phát hiện sớm và can thiệp kịp thời. Do vậy, nhu cầu phát triển và sản xuất sinh phẩm xét nghiệm sàng lọc và chẩn đoán nhiễm HPV tại cộng đồng ngày càng tăng. Kết quả nghiên cứu này đã cung cấp một công cụ trong đánh giá chất lượng sinh phẩm xét nghiệm HPV bằng kỹ thuật Realtime-PCR. Bộ mẫu chuẩn là sản phẩm khoa học của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, giúp các phòng thí nghiệm, cơ quan kiểm định chất lượng sinh phẩm chẩn đoán nâng cao tính tự chủ trong hoạt động đánh giá chất các sinh phẩm chẩn đoán sử dụng mẫu chuẩn trong nước mà không phụ thuộc vào nguồn mẫu chuẩn quốc tế. Trong trường hợp bộ mẫu chuẩn đảm bảo tính ổn định, có thể sản xuất với số lượng lớn để thiết lập tạo nên các bộ mẫu chuẩn cấp Quốc gia. Đây là cơ hội tốt để các nhà sản xuất trong nước có thể tiếp cận nguồn mẫu chuẩn, sử dụng trong công tác nội kiểm để đánh giá chất lượng các sinh phẩm chẩn đoán HPV bằng kỹ thuật Realtime-PCR trong quá trình nghiên cứu và sản xuất. Việc phân tích các số liệu của đề tài sử dụng các phần mềm có giá trị tin cậy cao và có bản quyền được sử dụng trong phân tích thống kê sinh học như SPSS 20, phần mềm Mafft multiple alignment (MAFFT) phiên bản 7 để so sánh các trình tự nucleotit. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp maximum likelihood và đa hình nucleotit của các khung đọc mở E6, E7 và L1 được phân tích trên cơ sở so sánh các đoạn trình tự giải được của các mẫu phân lập tại Việt Nam so với trình tự tương ứng của prototype, sử dụng phần mềm Geneious, phiên bản 11.11.5. Nghiên cứu sinh đã có 10 năm học tập và làm việc trong công tác nghiên cứu, kiểm định vắc xin vi rút và xây dựng các bộ panel mẫu chuẩn và đánh giá chất lượng các bộ sinh phẩm.

4.3.5 Các mẫu đối chứng có sử dụng của phòng thí nghiệm và mẫu chuẩn Quốc tế

Các mẫu đối chứng được sử dụng trong nghiên cứu này là một phần quan trọng của các thử nghiệm trong đó có nước cũng như việc sử dụng IC trong bộ sinh phẩm đối chứng với các kết quả khi đánh giá. Trong nghiên cứu này chúng tôi có sử dụng thêm 02 mẫu chuẩn Quốc tế của HPV do Viện Quốc gia các sinh phẩm chuẩn (NIBSC) cung cấp. Trong đó, mẫu chuẩn ADN HPV16 có mã code 06/202 và mẫu chuẩn ADN HPV18 có mã code 06/206 được sử dụng trong quá trình thiết lập lên 5 bộ mẫu chuẩn cho đánh giá sinh phẩm chẩn đoán 14 týp HPV nguy cơ cao.

4.4 Bàn luận những hạn chế của đề tài

4.4.1 Hạn chế trong phân tích đặc điểm các yếu tố liên quan đến nhiễm HPV

Trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ sử dụng một phần thông tin trên phiếu thu thập thông tin liên quan đến nhân khẩu học của 3 nhóm đối tượng MSM, PNBD, nữ sinh viên để đánh giá mối liên quan giữa đặc điểm nhân khẩu học và nhiễm HPV. Qua đó, chúng tôi chỉ xem xét khía cạnh về nhân khẩu học như tuổi, trình độ học vấn, tình trạng hôn nhân và tình trạng hôn nhân liên quan đến nhiễm HPV ở các nhóm đối tượng mà không tập chung phân tích chuyên sâu về dịch tễ học.

4.4.2 Hạn chế trong xác định tỷ lệ nhiễm HPV và giải trình tự gen

Hạn chế của nghiên cứu này trong việc xác định tỷ lệ nhiễm HPV ở 3 thành phố của Việt Nam phụ thuộc nhiều vào mẫu thu thập đặc biệt là kỹ thuật lấy mẫu và phương pháp xét nghiệm. Nồng độ ADN trong một số mẫu lâm sàng HPV thấp sẽ dẫn đến khả năng khuếch đại kém gây ảnh hưởng đến hiệu quả giải trình tự gen chưa thành công ở một số mẫu. Chính vì vậy, ngoài những mẫu được lựa chọn trong nghiên cứu cần phải lựa chọn thêm những mẫu lưu đã có được kết quả từ nghiên cứu trước đó để làm tăng cỡ mẫu và đảm bảo được tỷ lệ thành công khi tiến hành giải trình tự gen L1, E6-E7 để xây dựng cây phát sinh loài cho 14 týp HPV nguy cơ cao tại Việt Nam. Tuy nhiên, mặc dù vậy do sự đa dạng của các týp HPV khác nhau tại

từng týp cho nên số lượng các chủng đưa vào nghiên cứu không thể đồng đều vì có những týp có nhiều mẫu nhưng có những týp chỉ có 1-2 mẫu. Trong tất cả các gen L1, E6-E7 đều khuếch đại thành công trừ gen L1 của týp HPV45 do nồng độ HPV ADN thu được tương đối thấp trong mẫu này.

4.4.3 Hạn chế trong quá trình tạo mẫu chuẩn plasmid

Trong nghiên cứu này, việc tạo ra 14 mẫu chuẩn có nguồn gốc plasmid tái tổ hợp vẫn chỉ có chứa một phần của hệ gen E6-E7 mà chưa tạo ra được plasmid tái tổ hợp chứa toàn bộ hệ gen, những mẫu này không thể thay thế hoàn toàn cho mẫu bệnh phẩm lâm sàng trong việc đánh giá sinh phẩm chẩn đoán. Các mẫu chuẩn đang sử dụng lưu trữ bảo quản ở dạng đông băng nên tính ổn định có thể thấp hơn mẫu đông khô, cần được đánh giá tính ổn định liên tục theo thời gian thực và tiến tới phát triển bộ mẫu chuẩn ở dạng đông khô thay thế.

4.4.4 Hạn chế trong quá trình tạo mẫu chuẩn từ mẫu lâm sàng

Việc tạo ra bộ mẫu chuẩn lâm sàng có số lượng mẫu khác nhau giữa các týp HPV do số lượng mẫu lâm sàng được phát triển phụ thuộc vào tỷ lệ mắc của từng týp HPV khác nhau trong quần thể người của mỗi quốc gia. Mẫu lâm sàng thu được của mỗi mẫu bệnh phẩm bị hạn chế về mặt thể tích. Có những týp HPV có tần suất xuất hiện khá cao như HPV52, HPV66/68, HPV39 còn một số týp có tần số xuất hiện rất thấp như HPV31, HPV33, HPV45... số mẫu thu được rất ít từ 1-2 mẫu. Do đó, để đảm bảo số lượng mẫu lâm sàng sử dụng cho nghiên cứu về đặc điểm phân tử cần lựa chọn thêm các mẫu lưu HPV từ các nghiên cứu trước hoặc trộn các mẫu plasmid trên nền mẫu lâm sàng để có đủ số mẫu để đưa vào nghiên cứu để thiết lập được các bộ mẫu chuẩn cho 14 týp HPV nguy cơ cao. Các Panel trong bộ mẫu chuẩn mới được phát triển trên quy mô phòng thí nghiệm với số lượng nhỏ và cần tiếp tục hoàn thiện thêm các mẫu thành viên và bổ sung thêm một số các mẫu để tăng thêm cỡ mẫu và tính đa dạng các thành viên trong bộ mẫu theo khuyến cáo của Tổ chức y tế thế giới (WHO) trong thời gian tiếp theo.

KẾT LUẬN

Tỷ lệ nhiễm HPV ở MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018 lần lượt là 29,8%, 26,4% và 4,2%.

Đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của các týp HPV nguy cơ cao thuộc dưới chi alpha 7 phân lập tại Việt Nam có quan hệ gần gũi với các chủng có nguồn gốc từ Đông Á như Nhật Bản, Thái Lan, Trung Quốc, Đài Loan. Các dòng lưu hành chủ yếu cho các týp HPV18, HPV 39, HPV 52, HPV 68 lần lượt là A1, A2, B2, C2. Các týp thuộc dưới chi alpha 9 và dưới chi alpha khác có kiểu gen đa dạng hơn giống với chủng ở nhiều nơi trên thế giới bao gồm các quốc gia thuộc châu Á, Mỹ la tinh. Các biến đổi trên các gen L1, E6 và E7 của các týp HPV nguy cơ cao không nhiều nhưng cũng góp phần vào sự đa dạng di truyền trên quần thể HPV tại Việt Nam. Dòng và dưới dòng trên gen L1 và E6 và E7 cho kết quả cơ bản tương đồng khi xây dựng trên cây phát sinh chủng loại.

Đề tài đã phát triển được Bộ mẫu chuẩn nhằm đánh giá cho sinh phẩm chẩn đoán Realtime-PCR cho 14 týp HPV nguy cơ cao gồm 5 panel mẫu chuẩn thành viên để đánh giá độ nhạy phân tích, độ đặc hiệu phân tích, độ nhạy lâm sàng, độ đặc hiệu lâm sàng và độ chính xác.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Nghiên cứu đã đưa ra được tỷ lệ nhiễm HPV ở MSM, PNBD và nữ sinh viên tại Việt Nam, 2017-2018 lần lượt là 29,8%, 26,4% và 4,2% và sự phân bố các týp HPV tại Việt Nam.

2. Nghiên cứu đã đưa ra được đặc điểm phân tử vùng gen L1, E6 và E7 của 134 mẫu và dựng cây phát sinh loài cho 14 týp HPV nguy cơ cao. Các chủng Việt Nam thuộc týp dưới chi alpha 7 có quan hệ gần gũi với các chủng có nguồn gốc từ Đông Á như Nhật Bản, Thái Lan, Trung Quốc, Đài Loan. Các chủng Việt Nam thuộc týp dưới chi alpha 9 và dưới chi alpha khác có đa dạng di truyền cao hơn và giống với chủng ở nhiều nơi trên thế giới bao gồm các quốc gia thuộc châu Á, Mỹ la tinh. Dòng và dưới dòng trên gen L1 và E6 và E7 cho kết quả cơ bản tương đồng khi xây dựng trên cây phát sinh chủng loại.

3. Nghiên cứu đã phát triển Bộ mẫu chuẩn từ 14 plasmid tái tổ hợp và mẫu bệnh phẩm lâm sàng nhằm đánh giá sinh phẩm chẩn đoán Realtime-PCR cho 14 týp HPV nguy cơ cao.

KHUYẾN NGHỊ

1. Đẩy mạnh công tác tuyên truyền và tiêm chủng vắc xin cho các nhóm đối tượng kể cả nhóm đối tượng có nguy cơ nhiễm HPV cao gồm MSM, PNBD.
2. Tiếp tục nghiên cứu phát triển vắc xin HPV tập chung vào các týp HPV có tỷ lệ nhiễm cao tại Việt Nam.
3. Phát triển, cập nhật bộ mẫu chuẩn lâm sàng nhằm tăng cỡ mẫu và số lượng các chủng mới.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyen VAN Trang, Kiesha Prem, Zheng Quan Toh, Bui Thi Viet Ha, Pham Thi Ngoc Lan, Hau Phuc Tran, Quang Duy Pham, Nghia VAN Khuu, Mark Jit, Dung Thi Luu, LE Thi Khanh Ly, VAN Cao, Tam Duong LE Ha, Kathryn Bright, Suzanne M Garland, Dang Duc Anh, Kim Mulholland (2022), “Prevalence and Determinants of Vaginal Infection With Human Papillomavirus Among Female University Students in Vietnam”. *In Vivo*, 36(1), pp. 241-250
2. Chu Thi Ngoc Mai, Nguyen Van Chien, Luu Thị Dung, Tran Thi Nguyet Lan, Le Thi Khanh Ly, Dang Đức Anh, Nguyen Van Trang (2021), “Establishment of specifications of the multiplex real-time PCR kit (NIHE-RealtimePCR hrHPV) for the detection of high-risk HPV genotypes. *Vietnam Journal of Preventive Medicine*, 31 (4), pp, 28 – 36
3. Luu Thị Dung, Chủ Thị Ngọc Mai, Trịnh Thị Hồng Nhung, Lê Thị Khánh Ly, Lê Anh Tuấn, Đoàn Hải Yên, Phan Thị Ngà, Nguyễn Vân Trang. “Đặc điểm phân tử của các chủng HPV68 phát hiện ở phụ nữ tại Việt Nam”. *Tạp chí y học dự phòng*, 2022, 32 (3), 9-22
4. Luu Thị Dung, Vũ Thị Thu Hường, Đoàn Hữu Thiên, Đinh Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Tường An, Chủ Thị Ngọc Mai, Phan Thị Ngà, Nguyễn Vân Trang. “Thiết lập các bộ mẫu chuẩn cho 14 týp HPV nguy cơ cao để xây dựng và đánh giá tiêu chí kỹ thuật cho sinh phẩm chẩn đoán HPV bằng phương pháp Realtime-PCR”. *Tạp chí y học dự phòng*, 2022, 32 (3), 23-33

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Cao Minh Chu, Lê Trung Thọ (2013), "Nghiên cứu tỷ lệ nhiễm Human papilloma virus ở phụ nữ Cần Thơ và một số yếu tố liên quan", *Tạp chí Y học thực hành*, 857, tr. 41-44.
2. Đoàn Trọng Trung, Lương Xuân Hiếu (2010), "Tìm hiểu ảnh hưởng của một số yếu tố sinh sản tới tỷ lệ mắc ung thư cổ tử cung ở phụ nữ Miền Bắc Việt Nam", *Tạp chí Y học thực hành*, 745, tr. 48-50.
3. Hoàng Thị Thanh Huyền (2014), *Xác định tỷ lệ nhiễm và genotype của Human papillomavirus trên gái mại dâm tại Hải Phòng, Việt Nam*, Luận án, Đại học Y Hà Nội.
4. Hoàng Thị Thanh Huyền, Tạ Thành Văn (2011), "Sự phân bố genotype của Human papilloma virus trên gái mại dâm tại miền bắc Việt Nam", *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, tr. 7-11.
5. Lâm Đức Tâm (2017), *Nghiên cứu tỷ lệ nhiễm Human papiloma virus, một số yếu tố liên quan và kết quả điều trị các tổn thương cổ tử cung ở phụ nữ thành phố Cần Thơ*, Luận án, Đại học Y - Dược Huế.
6. Lê Thị Thanh Hà, Vũ Thị Hoàng Lan, Lương Thu Oanh (2010), "Đặc điểm dịch tễ học nhiễm HPV của phụ nữ tại hai quận thuộc Hà Nội và Thành phố Hồ Chí Minh năm 2010, Dịch tễ và chương trình phòng chống ung thư", *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, 1, tr. 138-144.
7. Lê Trung Thọ, Trần Văn Hợp (2009), "Nghiên cứu tỷ lệ nhiễm HPV ở cộng đồng phụ nữ Hà Nội, tìm hiểu một số yếu tố liên quan", *Tạp chí học thành phố Hồ Chí Minh*, 13(1), tr. 185-189.
8. Nguyễn Thị Phương Mai (2019), *Nghiên cứu genotype của Human papillomavirus trên một số ung thư sinh dục nữ*, Luận án, Đại học Y Hà Nội.

9. Tiêu chuẩn quốc gia (2017), *TCVN 8890:2017. ISO GUIDE 30:2015. Mẫu chuẩn - Thuật ngữ và Định nghĩa.*
10. Bộ Y tế, (2014), *Kết quả giám sát kết hợp hành vi và các chỉ số sinh học HIV/STI (IBBS) tại Việt Nam – Vòng III, 2013*, NIHE.
11. Cục Phòng, chống HIV/AIDS, (2016), *Báo cáo giám sát trọng điểm lồng ghép hành vi (HSS/HSS+) năm 2016.*

Tiếng Anh

12. Alhamlan, F. S., et al. (2020), "Clinical comparison of two human papillomavirus detection assays: GenoFlow and reverse line blot", *J Infect Dev Ctries*, 14(1), pp. 97-103.
13. Andersen, K., et al. (2022), "Targeted Next Generation Sequencing for Human Papillomavirus Genotyping in Cervical Liquid-Based Cytology Samples", *Cancers (Basel)*, 14(3), pp. 652.
14. Aubin, F., et al. (2011), "Genital human Papillomavirus infection in patients with autoimmune inflammatory diseases", *Joint Bone Spine*, 78(5), pp. 460-465.
15. Aydin, I., et al. (2014), "Large scale RNAi reveals the requirement of nuclear envelope breakdown for nuclear import of human papillomaviruses", *PLoS Pathog*, 10(5), p. e1004162.
16. Balanda, M., et al. (2019), "Genetic variability of human papillomavirus type 66 L1 gene among women presenting for cervical cancer screening in Chile", *Med Microbiol Immunol*, 208(6), pp. 757-771.
17. Bernard, H. U. (1994), "Coevolution of papillomaviruses with human populations", *Trends Microbiol*, 2(4), pp. 140-143.

18. Bernard, H. U., et al. (2010), "Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments", *Virology*, 401(1), pp. 70-79.
19. Bienkowska-Haba, M., Patel, H. D., and Sapp, M. (2009), "Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection", *PLoS Pathog*, 5(7), p. e1000524.
20. Bishop, B., et al. (2007), "Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies", *J Biol Chem*, 282(43), pp. 32803-32811.
21. Bontkes, H. J., et al. (1999), "Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16", *J Gen Virol*, 80 (Pt 2), pp. 409-417.
22. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S (2021), *Human Papillomavirus and Related Diseases in Viet Nam, Summary Report 22 October 2021*, ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre).
23. Burchell, A. N. (2018), "One Step Closer in Understanding the Natural History of Anal Infection With High-Risk Human Papillomavirus", *J Infect Dis*, 218(7), pp. 1015-1017.
24. Burchell, A. N., et al. (2011), "Genital transmission of human papillomavirus in recently formed heterosexual couples", *J Infect Dis*, 204(11), pp. 1723-1729.
25. Burd, E. M. (2003), "Human papillomavirus and cervical cancer", *Clin Microbiol Rev*, 16(1), pp. 1-17.
26. Burk, R. D., Harari, A., and Chen, Z. (2013), "Human papillomavirus genome variants", *Virology*, 445(1-2), pp. 232-243.

27. Calleja-Macias, I. E., et al. (2004), "Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants", *Virology*, 319(2), pp. 315-323.
28. Calleja-Macias, I. E., et al. (2005), "Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16", *J Virol*, 79(21), pp. 13630-13640.
29. Chan, P. K., et al. (2002), "Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer", *J Natl Cancer Inst*, 94(16), pp. 1249-1253.
30. Chan, P. K., et al. (2013), "Geographical distribution and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 sequence variations", *Int J Cancer*, 132(11), pp. 2528-2536.
31. Chang Hun Lee, et al. (2016), "Anal Human Papillomavirus Infection among HIV-Infected Men in Korea", *PLoS One*, 11(8), p. e0161460.
32. Chang, Y. J., et al. (2011), "Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia", *Int J Cancer*, 129(4), pp. 965-973.
33. Chen, A. A., et al. (2015), "Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide", *J Virol*, 89(20), pp. 10680-10687.
34. Chen, A. A., et al. (2014), "Human papillomavirus 33 worldwide genetic variation and associated risk of cervical cancer", *Virology*, 448, pp. 356-362.
35. Chen, A. A., et al. (2014), "Human papillomavirus 45 genetic variation and cervical cancer risk worldwide", *J Virol*, 88(8), pp. 4514-4521.
36. Chen, X. S., et al. (2000), "Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16", *Mol Cell*, 5(3), pp. 557-567.

37. Chen, Z., et al. (2009), "Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97", *J Virol*, 83(3), pp. 1443-1455.
38. Chen, Z., et al. (2011), "Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67", *PLoS One*, 6(5), p. e20183.
39. Chen, Z., et al. (2013), "Evolution and taxonomic classification of alphapapillomavirus 7 complete genomes: HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68 and HPV70", *PLoS One*, 8(8), p. e72565.
40. Chen, Z., et al. (2018), "Classification and evolution of human papillomavirus genome variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61)", *Virology*, 516, pp. 86-101.
41. Chen, Z., et al. (2005), "Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses", *J Virol*, 79(11), pp. 7014-7023.
42. Chen, Zigui, et al. (2008), "Evolutionary Dynamics of Variant Genomes of Human Papillomavirus Types 18, 45, and 97", *J Virol*, 83, pp. 1443-1455.
43. Cheng SH, et al. (2014), "Screening and risk factors for anal cancer precursors in men infected with HIV in Taiwan", *J Med Virol*, 86, pp. 193-201.
44. Chow, L. T., Broker, T. R., and Steinberg, B. M. (2010), "The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia", *APMIS*, 118(6-7), pp. 422-449.
45. Clatts, M. C., et al. (2015), "Sexual practices, partner concurrency and high rates of sexually transmissible infections among male sex workers in three cities in Vietnam", *Sex Health*, 12(1), pp. 39-47.
46. Clifford, G. M., et al. (2006), "Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis", *AIDS*, 20(18), pp. 2337-2344.

47. Clifford, G. M., et al. (2019), "Human papillomavirus 16 sub-lineage dispersal and cervical cancer risk worldwide: Whole viral genome sequences from 7116 HPV16-positive women", *Papillomavirus Res*, 7, pp. 67-74.
48. Couture, M. C., et al. (2012), "Cervical human papillomavirus infection among young women engaged in sex work in Phnom Penh, Cambodia: prevalence, genotypes, risk factors and association with HIV infection", *BMC Infect Dis*, 12, p. 166.
49. Cranston, R. D., et al. (2019), "Prevalence and determinants of anal human papillomavirus infection in men who have sex with men and transgender women", *Int J STD AIDS*, 30(2), pp. 154-162.
50. Cutts, F. T., et al. (2007), "Human papillomavirus and HPV vaccines: a review", *Bull World Health Organ*, 85(9), pp. 719-726.
51. Cuzick, J., et al. (2008), "Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries", *Vaccine*, 26 Suppl 10, pp. K29-41.
52. Dasgupta, J., et al. (2011), "Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus", *J Biol Chem*, 286(4), pp. 2617-2624.
53. De Martel C., et al. (2012), "Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis", *Lancet Oncol*. 13(6), pp. 607-615.
54. De Sanjosé, S., et al. (2007), "Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis", *Lancet Infect Dis*, 7(7), pp. 453-459.
55. De Villiers, E. M., et al. (2004), "Classification of papillomaviruses", *Virology*, 324(1), pp. 17-27.
56. Del Amo, J., et al. (2009), "Prevalence and risk factors of high-risk human papillomavirus in female sex workers in Spain: differences by geographical origin", *J Womens Health (Larchmt)*, 18(12), pp. 2057-2064.

57. Deschuyteneer, M., et al. (2010), "Molecular and structural characterization of the L1 virus-like particles that are used as vaccine antigens in Cervarix, the AS04-adjuvanted HPV-16 and -18 cervical cancer vaccine", *Hum Vaccin*, 6(5), pp. 407-419.
58. Didelot-Rousseau, M. N., et al. (2006), "Human papillomavirus genotype distribution and cervical squamous intraepithelial lesions among high-risk women with and without HIV-1 infection in Burkina Faso", *Br J Cancer*, 95(3), pp. 355-362.
59. Diop-Ndiaye, H., et al. (2019), "Human Papillomavirus infection in senegalese female sex workers", *Papillomavirus Res*, 7, pp. 97-101.
60. Doorbar, J. (2006), "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer", *Clin Sci (Lond)*, 110(5), pp. 525-541.
61. Eklund, C., et al. (2012), "The 2010 global proficiency study of human papillomavirus genotyping in vaccinology", *J Clin Microbiol*, 50(7), pp. 2289-2298.
62. Elissa Meites, et al., "Monitoring for Human Papillomavirus Vaccine Impact Among Gay, Bisexual, and Other Men Who Have Sex With Men—United States", *The Journal of Infectious Diseases*, 214, pp. 689-696.
63. Ersan, G., et al. (2013), "The prevalence and risk factors of human papillomavirus in female sex workers", *Eurasian J Med*, 45(1), pp. 16-20.
64. FDA (2017), *Establishing the Performance Characteristics of In Vitro Diagnostic Devices for the Detection or Detection and Differentiation of Human Papillomaviruses*.
65. Forhan, S. E., et al. (2009), "Prevalence of sexually transmitted infections among female adolescents aged 14 to 19 in the United States", *Pediatrics*, 124(6), pp. 1505-1512.

66. Formentin, A., et al. (2013), "Human papillomavirus type 52 polymorphism and high-grade lesions of the uterine cervix", *Int J Cancer*, 132(8), pp. 1821-2830.
67. Franceschi S., et al. (2006), "Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide", *Int J Cancer*, 119(11), pp. 2677-2684.
68. Fuentes-Gonzalez, A. M., et al. (2019), "Intratype variants of the E2 protein from human papillomavirus type 18 induce different gene expression profiles associated with apoptosis and cell proliferation", *Arch Virol*, 164(7), pp. 1815-1827.
69. Gagnon, S., et al. (2004), "Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women", *J Infect Dis*, 190(9), pp. 1575-1585.
70. Gao, B., et al. (2021), "The characteristics and risk factors of human papillomavirus infection: an outpatient population-based study in Changsha, Hunan", *Sci Rep*, 11(1), p. 15128.
71. Gao, R., et al. (2019), "Anti-tumor effect of aloe-emodin on cervical cancer cells was associated with human papillomavirus E6/E7 and glucose metabolism", *Onco Targets Ther.* 12, pp. 3713-3721.
72. Giuliano AR, et al. (2008), "Age-specific prevalence, incidence, and duration of human papillomavirus infections in a cohort of 290 US men", *The Journal of Infectious Diseases.* 198, pp. 827-835.
73. Glick, S. N., et al. (2014), "High rates of incident and prevalent anal human papillomavirus infection among young men who have sex with men", *J Infect Dis*, 209(3), pp. 369-376.

74. Goldstone, S., et al. (2011), "Prevalence of and risk factors for human papillomavirus (HPV) infection among HIV-seronegative men who have sex with men", *J Infect Dis*, 203(1), pp. 66-74.
75. He, J., et al. (2021), "Genetic variability of human papillomavirus type 39 based on E6, E7 and L1 genes in Southwest China", *Virol J*, 18(1), p. 72.
76. Hernandez, B. Y. and Vu Nguyen, T. (2008), "Cervical human papillomavirus infection among female sex workers in southern Vietnam", *Infect Agent Cancer*, 3, p. 7.
77. Ho, L., et al. (1993), "The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations", *J Virol*, 67(11), pp. 6413-6423.
78. Ho, L., et al. (1991), "Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree", *J Clin Microbiol*, 29(9), pp. 1765-1772.
79. Hoang, H. T., et al. (2013), "Infection with high-risk HPV types among female sex workers in northern Vietnam", *J Med Virol*, 85(2), pp. 288-294.
80. HPV information centre (2016), *Vietnam: Human Papillomavirus and Related Diseases Report 2015*, accessed 3/12/2016, from <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/VNM.pdf>.
81. HPV Tests For Cervical Cancer Screening (2021).
82. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer (2021).
83. Huson, D. H. and Steel, M. (2004), "Phylogenetic trees based on gene content", *Bioinformatics*, 20(13), pp. 2044-2049.

84. Iacobellis, M., et al. (2018), "Clinical validation of REALQUALITY RQ-HPV Screen according to the international guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for cervical screening", *Viol J*, 15(1), p. 48.
85. Imai, H., et al. (2015), "Prevalence, Potential Predictors, and Genotype-Specific Prevalence of Human Papillomavirus Infection among Sexually Active Students in Japan", *PLoS One*, 10(7), p. e0132462.
86. Jenkins, A., et al. (2013), "Simultaneous detection, typing and quantitation of oncogenic human papillomavirus by multiplex consensus real-time PCR", *J Virol Methods*, 187(2), pp. 345-351.
87. Jing, Y., et al. (2018), "Phylogeny and polymorphism in the long control regions E6, E7, and L1 of HPV Type 56 in women from southwest China", *Mol Med Rep*, 17(5), pp. 7131-7141.
88. Kamimura, A., et al. (2018), "Knowledge and beliefs about HPV among college students in Vietnam and the United States", *J Infect Public Health*, 11(1), pp. 120-125.
89. Kombe Kombe, A. J., et al. (2020), "Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation", *Front Public Health*, 8, p. 552028.
90. Kovacevic, G., et al. (2019), "Prevalence of oncogenic Human papillomavirus and genetic diversity in the L1 gene of HPV16 HPV 18 HPV31 and HPV33 found in women from Vojvodina Province Serbia", *Biologicals*, 58, pp. 57-63.
91. Lehoux, M., D'Abramo, C. M., and Archambault, J. (2009), "Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis", *Public Health Genomics*, 12(5-6), pp. 268-280.
92. Leung, K. M., et al. (2013), "Prevalence of abnormal Papanicolaou smears in female sex workers in Hong Kong", *Hong Kong Med J*, 19(3), pp. 203-206.

93. Li, H. M., et al. (2012), "Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection among female sex workers in Guangxi, China: implications for interventions", *J Med Virol*, 84(5), pp. 798-803.
94. Lichtig, H., et al. (2006), "HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6", *Virology*, 350(1), pp. 216-227.
95. Liu, Y., et al. (2017), "Whole-Genome Analysis of Human Papillomavirus Types 16, 18, and 58 Isolated from Cervical Precancer and Cancer Samples in Chinese Women", *Sci Rep*, 7(1), p. 263.
96. Longuet, M., Beaudenon, S., and Orth, G. (1996), "Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39", *J Clin Microbiol*, 34(3), pp. 738-744.
97. Luchters, S. 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 Infect Dis*, 10, p. 18.
98. Machalek, D. A., et al. (2012), "The epidemiology and natural history of anal human papillomavirus infection in men who have sex with men", *Sex Health*, 9(6), pp. 527-537.
99. Manos, M. M. (1989), "Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses", *Cancer Cell Int*, pp. 209-214.
100. Marais, D. J., et al. (2000), "The impact of human immunodeficiency virus type 1 status on human papillomavirus (HPV) prevalence and HPV antibodies in serum and cervical secretions", *J Infect Dis*, 182(4), pp. 1239-1242.
101. McLaughlin-Drubin, M. E. and Münger, K. (2009), "The human papillomavirus E7 oncoprotein", *Virology*, 384(2), pp. 335-344.

102. McQuillan, Geraldine, et al. (2017), *Prevalence of HPV in Adults Aged 18–69: United States, 2011–2014*, accessed, from <https://www.cdc.gov/nchs/products/databriefs/db280.htm>.
103. Meijer, C. J., et al. (2009), "Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older", *Int J Cancer*, 124(3), pp. 516-520.
104. Micalessi, I. M., et al. (2011), "High-throughput detection, genotyping and quantification of the human papillomavirus using real-time PCR", *Clin Chem Lab Med*, 50(4), pp. 655-661.
105. Mirabello, L., et al. (2017), "HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis", *Cell*, 170(6), pp. 1164-1174 e6.
106. Mitchell, M. F., et al. (1996), "Cervical human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: a review", *J Natl Cancer Inst Monogr*, (21), pp. 17-25.
107. Molano, M., et al. (2002), "Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology", *Br J Cancer*, 87(3), pp. 324-333.
108. Moschonas, G. D., et al. (2017), "Association of codon 72 polymorphism of p53 with the severity of cervical dysplasia, E6-T350G and HPV16 variant lineages in HPV16-infected women", *J Med Microbiol*, 66(9), pp. 1358-1365.
109. Muhr, L. S. A., et al. (2021), "Human Papillomavirus Detection by Whole-Genome Next-Generation Sequencing: Importance of Validation and Quality Assurance Procedures", *Viruses*, 13(7), pp.1323.
110. Muñoz, N., et al. (2003), "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer", *N Engl J Med*, 348(6), pp. 518-527.

111. National Cancer Institute (2021), *HPV and cancer*, accessed, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-and-cancer>.
112. National Cancer Institute (2021), *Human Papillomavirus (HPV) Vaccines*, accessed, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-vaccine-fact-sheet>.
113. Nielsen, A., et al. (2009), "Acquisition of high-risk human papillomavirus infection in a population-based cohort of Danish women", *Sex Transm Dis*, 36(10), pp. 609-615.
114. Nielsen, A., et al. (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(3), pp. 276-282.
115. Nogueira Dias Genta, Maria Luiza, et al. (2017), "Multiple HPV genotype infection impact on invasive cervical cancer presentation and survival", *PloS one*, 12(8), pp. e0182854-e0182854.
116. Nyitray, A. G., et al. (2011), "Age-specific prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus (HPV) among men who have sex with women and men who have sex with men: the HPV in men (HIM) study", *J Infect Dis*, 203(1), pp. 49-57.
117. O'Leary, M. C., et al. (2011), "HPV type-specific prevalence using a urine assay in unvaccinated male and female 11- to 18-year olds in Scotland", *Br J Cancer*, 104(7), pp. 1221-1226.
118. Oh, J. K., et al. (2008), "Acquisition of new infection and clearance of type-specific human papillomavirus infections in female students in Busan, South Korea: a follow-up study", *BMC Infect Dis*, 8, p. 13.
119. Pagliusi, S. R. and Garland, S. M. (2007), "International standard reagents for HPV detection", *Dis Markers*, 23(4), pp. 283-296.

120. Palefsky, J. M., et al. (1998), "High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men", *AIDS*, 12(5), pp. 495-503.
121. Patzi-Churqui, M., et al. (2020), "Prevalence of viral sexually transmitted infections and HPV high-risk genotypes in women in rural communities in the Department of La Paz, Bolivia", *BMC Infect Dis*, 20(1), p. 204.
122. Peng, R. R., 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", *Sex Health*, 9(2), pp. 113-119.
123. Pham, T. H., et al. (2003), "Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam", *Int J Cancer*, 104(2), pp. 213-220.
124. Pham, T. T. T., et al. (2018), "Human Papillomavirus Genotypes and HPV16 E6/E7 Variants among Patients with Genital Cancers in Vietnam", *Jpn J Infect Dis*, 71(6), pp. 419-426.
125. Pimenoff, V. N., de Oliveira, C. M., and Bravo, I. G. (2017), "Transmission between Archaic and Modern Human Ancestors during the Evolution of the Oncogenic Human Papillomavirus 16", *Mol Biol Evol*, 34(1), pp. 4-19.
126. Pinheiro, M., et al. (2021), "Phylogenomic Analysis of Human Papillomavirus Type 31 and Cervical Carcinogenesis: A Study of 2093 Viral Genomes", *Viruses*, 13(10), pp. 1948.
127. Plummer, M., Vaccarella, S., and Franceschi, S. (2011), "Multiple human papillomavirus infections: the exception or the rule?", *J Infect Dis*, 203(7), pp. 891-893.
128. Poljak, M., et al. (2020), "Commercially available molecular tests for human papillomaviruses: a global overview", *Clin Microbiol Infect*, 26(9), pp. 1144-1150.

129. Pow-Sang, M. R., et al. (2002), "Cancer of the penis", *Cancer Control*, 9(4), pp. 305-314.
130. Pretet, J. L., Charlot, J. F., and Mougin, C. (2007), "Virological and carcinogenic aspects of HPV", *Bull Acad Natl Med*, 191(3), pp. 611-623; discussion 623.
131. Quinn, R., et al. (2012), "Human papillomavirus infection in men who have sex with men in Lima, Peru", *AIDS Res Hum Retroviruses*, 28(12), pp. 1734-1738.
132. Quint, W. G., et al. (2006), "Results of the first World Health Organization international collaborative study of detection of human papillomavirus DNA", *J Clin Microbiol*, 44(2), pp. 571-579.
133. Reuter, S., et al. (1991), "Characterization of a novel human papillomavirus DNA in the cervical carcinoma cell line ME180", *J Virol*, 65(10), pp. 5564-5568.
134. Rho, J., et al. (1994), "Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59", *Virology*, 203(1), pp. 158-161.
135. Richards, K. F., et al. (2013), "Multiple heparan sulfate binding site engagements are required for the infectious entry of human papillomavirus type 16", *J Virol*, 87(21), pp. 11426-11437.
136. Richards, R. M., et al. (2006), "Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection", *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(5), pp. 1522-1527.
137. Richter, K., et al. (2013), "Age-specific prevalence of cervical human papillomavirus infection and cytological abnormalities in women in Gauteng Province, South Africa", *S Afr Med J*, 103(5), pp. 313-317.
138. Rodriguez, A. C., et al. (2007), "The natural history of human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia among young women in the

- Guanacaste cohort shortly after initiation of sexual life", *Sex Transm Dis*, 34(7), pp. 494-502.
139. Roman, Ann and Munger, Karl (2013), "The papillomavirus E7 proteins", *Virology*, 445(1), pp. 138-168.
 140. Sacace, Biotechnologies, (2021), Sacace™ HPV Genotypes 14 Real-TM Quant Handbook.
 141. Sakakibara, N., Chen, D., and McBride, A. A. (2013), "Papillomaviruses use recombination-dependent replication to vegetatively amplify their genomes in differentiated cells", *PLoS Pathog*, 9(7), p. e1003321.
 142. Satterwhite, C. L., et al. (2013), "Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008", *Sex Transm Dis*, 40(3), pp. 187-193.
 143. Schiffman, M. and Wentzensen, N. (2013), "Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22(4), pp. 553-560.
 144. Slatko, B. E., Gardner, A. F., and Ausubel, F. M. (2018), "Overview of Next-Generation Sequencing Technologies", *Curr Protoc Mol Biol*, 122(1), p. e59.
 145. Sohrabi, Amir, et al. (2017), "Is incidence of multiple HPV genotypes rising in genital infections?", *Journal of Infection and Public Health*, 10(6), pp. 730-733.
 146. Soohoo, M., et al. (2013), "Cervical HPV Infection in Female Sex Workers: A Global Perspective", *Open AIDS J*, 7, pp. 58-66.
 147. "Specificity, sensitivity and cost" (2007), *Nature Reviews Cancer*, 7(12), pp. 893-893.
 148. Strong, C., et al. (2020), "Prevalence and risk factors of anogenital human papillomavirus infection in a community sample of men who have sex with

men in Taiwan: baseline findings from a cohort study", *Sex Transm Infect*, 96(1), pp. 62-66.

149. Sweet, K., et al. (2020), "Prevalence, incidence, and distribution of human papillomavirus types in female sex workers in Kenya", *Int J STD AIDS*, 31(2), pp. 109-118.
150. Tan, G., et al. (2019), "Distribution of HPV 16 E6 gene variants in screening women and its associations with cervical lesions progression", *Virus Res*, 273, p. 197740.
151. Tawe, L., et al. (2022), "Genetic diversity in L1 ORF of human papillomavirus in women with cervical cancer with and without human immunodeficiency virus in Botswana and Kenya", *BMC Infect Dis*, 22(1), p. 95.
152. Tenjimbayashi, Y., et al. (2017), "Whole-genome analysis of human papillomavirus genotypes 52 and 58 isolated from Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer", *Infect Agent Cancer*, 12, p. 44.
153. Tham, Dung, et al. (2015), "High-risk human papillomavirus (HPV) infection among adolescent girls: Hospital-based study", 2, pp. 111-117.
154. Tham, Dung, et al. (2017), "Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) infection and genotype distribution among women in Vietnam: A literature review to improve health programs against anogenital cancer", 27, pp. 11-21.
155. Thomas, D. B., et al. (2001), "Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. III. The role of husbands and commercial sex workers", *Am J Epidemiol*, 153(8), pp. 740-748.
156. Tran, L. T., et al. (2015), "Risk factors for high-risk and multi-type Human Papillomavirus infections among women in Ho Chi Minh City, Vietnam: a cross-sectional study", *BMC Womens Health*, 15, p. 16.

157. Vallès, X., et al. (2009), "High prevalence of human papillomavirus infection in the female population of Guatemala", *Int J Cancer*, 125(5), pp. 1161-1167.
158. Van Doorslaer, K. (2013), "Evolution of the papillomaviridae", *Virology*, 445(1-2), pp. 11-20.
159. Van, S. N., et al. (2017), "Prevalence of Cervical Infection and Genotype Distribution of Human Papilloma Virus Among Females in Da Nang, Vietnam", *Anticancer Res*, 37(3), pp. 1243-1247.
160. Vieira, R. C., et al. (2015), "Prevalence of type-specific HPV among female university students from northern Braxin", *Infect Agent Cancer*, 10, p. 21.
161. Vorsters, A., et al. (2016), "Prevalence of high-risk human papillomavirus and abnormal pap smears in female sex workers compared to the general population in Antwerp, Belgium", *BMC Public Health*, 16, p. 477.
162. Vu, L. T., Bui, D., and Le, H. T. (2013), "Prevalence of cervical infection with HPV type 16 and 18 in Vietnam: implications for vaccine campaign", *BMC Cancer*, 13, p. 53.
163. Vu VD, Le GM, Nguyen SM, Clatts MC, Goldsamt LA (2013), "High Prevalence of Gonorrhoea and HPV Among Male Sex Workers in Three Cities of Vietnam: Challenges in Addressing HIV Epidemic Among MSM Populations", *Sexually Transmitted Infections*, 89:A182.
164. Walboomers, J. M., et al. (1995), "Human papillomavirus in false negative archival cervical smears: implications for screening for cervical cancer", *J Clin Pathol*, 48(8), pp. 728-732.
165. WHO, (2009), *Human papillomavirus laboratory manual. First editioned.*
166. WHO, (2011), *WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines.*

167. WHO, (2017), *Technical Guidance Series for WHO Prequalification – Diagnostic Assessment: Principles of performance studies*, World Health Organization, Geneva.
168. WHO, (2018), *TSS-4 In vitro diagnostic medical devices (IVDs) used for the detection of high-risk human papillomavirus (HPV) genotypes in cervical cancer screening*.
169. WHO, (2018), *WHO leads the way towards the elimination of cervical cancer as a public health concern*, accessed.
170. WHO, (2022), *Cervical cancer*, accessed, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>.
171. WHO International Agency for Research on Cancer, (2007), *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses*, Vol. 90.
172. Wilkinson, D. E., et al. (2010), "Establishment of the 1st World Health Organization international standards for human papillomavirus type 16 DNA and type 18 DNA", *Int J Cancer*, 126(12), pp. 2969-2983.
173. Wissing, M. D., et al. (2019), "Human Papillomavirus Viral Load and Transmission in Young, Recently Formed Heterosexual Couples", *J Infect Dis*, 220(7), pp. 1152-1161.
174. Wong, F. K., Ching, J. C., and Chow, J. K. (2010), "Comparison of the DiagCor GenoFlow Human Papillomavirus Array Test and Roche Linear Array HPV Genotyping Test", *Open Virol J*, 4, pp. 169-174.
175. Wu, X. L., et al. (2010), "Detection of HPV types and neutralizing antibodies in women with genital warts in Tianjin City, China", *Virol Sin*, 25(1), pp. 8-17.

176. Wyant, P. S., et al. (2011), "Phylogeny and polymorphism in the long control region, E6, and L1 of human papillomavirus types 53, 56, and 66 in central Braxin", *Int J Gynecol Cancer*, 21(2), pp. 222-229.
177. Xi, L. F., et al. (2007), "Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(1), pp. 4-10.
178. Xu, H. H., et al. (2018), "Human papillomavirus (HPV) 18 genetic variants and cervical cancer risk in Taizhou area, China", *Gene*, 647, pp. 192-197.
179. Xu, J., et al. (2019), "Genetic variability of human papillomavirus type 51 E6, E7, L1 and L2 genes in Southwest China", *Gene*, 690, pp. 99-112.
180. Yamada, T., et al. (1997), "Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective", *J Virol*, 71(3), pp. 2463-2472.
181. Yim, E. K. and Park, J. S. (2005), "The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis", *Cancer Res Treat*, 37(6), pp. 319-324.
182. Yu, J. H., et al. (2019), "Genetic variability and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 genes in Taizhou area, China", *Gene*, 686, pp. 171-176.
183. Zandberg, D. P., et al. (2013), "The role of human papillomavirus in nongenital cancers", *CA Cancer J Clin*, 63(1), pp. 57-81.
184. Zhang, D. Y., et al. (2014), "HPV infections among MSM in Shenzhen, China", *PLoS One*, 9(5), p. e96364.
185. Zhang, J., et al. (2018), "Genetic variability in E5, E6, E7 and L1 genes of human papillomavirus type 31", *Mol Med Rep*, 17(4), pp. 5498-5507.
186. Zhang, R., et al. (2013), "Proficiency test for human papillomavirus genotyping in china", *Intervirology*, 56(5), pp. 295-301.

187. Zhang, W., et al. (2014), "Vesicular trafficking of incoming human papillomavirus 16 to the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum requires gamma-secretase activity", *mBio*, 5(5), pp. e01777-14.
188. Zhao, J., et al. (2019), "Phylogeny and polymorphism in the E6 and E7 of human papillomavirus: alpha-9 (HPV16, 31, 33, 52, 58), alpha-5 (HPV51), alpha-6 (HPV53, 66), alpha-7 (HPV18, 39, 59, 68) and alpha-10 (HPV6, 44) in women from Shanghai", *Infect Agent Cancer*, 14, p. 38.
189. Zhao, Q., et al. (2013), "Virus-like particle-based human vaccines: quality assessment based on structural and functional properties", *Trends Biotechnol*, 31(11), pp. 654-663.
190. Zhe, X., et al. (2019), "Genetic variations in E6, E7 and the long control region of human papillomavirus type 16 among patients with cervical lesions in Xinjiang, China", *Cancer Cell Int*, 19, p. 65.
191. Zhou, Z., et al. (2019), "Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations associated with cervical cancer in a Han Chinese population", *Infect Genet Evol*, 73, pp. 13-20.

PHỤ LỤC 1

Phụ lục 1. 1 Đa dạng di truyền các týp HPV tại Việt Nam

TT	Chủng HPV	Trình tự	Tên mẫu	Dưới dòng	Nguồn gốc	Địa điểm thu thập mẫu
1	HPV18	L1	A268	A1	Costa Rica	TP. HCM
2			TEB052	A1	Nhật Bản	Hà Nội
3			A149	A1	Thái Lan	Hà Nội
4			F1142	A1	Thái Lan	Hà Nội
5		E6-E7	A149	A1	Costa Rica	Hà Nội
6			A264	A1	Costa Rica	Hà Nội
7			TEB094	A1	Costa Rica	Hà Nội
8			A549	A1	Costa Rica	Hà Nội
9			B347	A1	Costa Rica	TP.HCM
10			B542	A1	Costa Rica	TP.HCM
11			A268	A1	Costa Rica	Hà Nội
12			TEB052	A1	Costa Rica	Hà Nội
13			F1142	A1	Costa Rica	Hà Nội
14	HPV39	L1	A456	A2	Đài Loan	Hà Nội
15			A445	A2	Đài Loan	Hà Nội
16			S1533	A2	Đài Loan	Hà Nội
17		E6-E7	A456	A2	Đài Loan	Hà Nội
18			A445	A2	Đài Loan	Hà Nội
19			S1533	A2	Đài Loan	Hà Nội
20			S2472	A2	Đài Loan	T.T Huế
21	HPV45	E6-E7	S1344	B2	Costa Rica	TP.HCM
22	HPV59	L1	M1059	A1	Trung Quốc	Hà Nội

TT	Chủng HPV	Trình tự	Tên mẫu	Dưới dòng	Nguồn gốc	Địa điểm thu thập mẫu
23			F1145	B	Luxembourg, Trung Quốc	Hà Nội
24			F1108	B	Luxembourg, Trung Quốc	Hà Nội
25		E6-E7	M1059	A1	Trung Quốc	Hà Nội
26			F1145	B	Luxembourg	Hà Nội
27			F1108	B	Trung Quốc	Hà Nội
28	HPV68	L1	F1100	C2	Đài Loan	Hà Nội
29			A556	C2	Đài Loan	Hà Nội
30			B511	C2	Đài Loan	TP.HCM
31			A232	C2	Trung Quốc	Hà Nội
32			F1104	C2	Trung Quốc	Hà Nội
33		E6-E7	F1149	E	Trung Quốc, Costa Rica, Braxin	Hà Nội
34			F1100	C2	Đài Loan	Hà Nội
35			B144	C2	Đài Loan	TP.HCM
36			A232	C2	Đài Loan	Hà Nội
37			F1104	C2	Đài Loan	Hà Nội
38			S2416	C2	Đài Loan	T.T.Huế
39	HPV16	L1	B144	A3	Châu Âu	TP.HCM
40			B344	A3	Châu Âu	TP.HCM
41			A412	A3	Châu Âu	Hà Nội
42			A248	A3	Châu Âu	Hà Nội
43			A435	A4	Đông Á	Hà Nội
44			A305	A4	Đông Á	Hà Nội

TT	Chủng HPV	Trình tự	Tên mẫu	Dưới dòng	Nguồn gốc	Địa điểm thu thập mẫu
45			TEB094	A4	Đông Á	Hà Nội
46			TEB101	A4	Đông Á	Hà Nội
47		E6E7	TE064	A1	Châu Âu	Hà Nội
48			A410	A1	Châu Âu	Hà Nội
49			B144	A3	Châu Âu	TP.HCM
50			A412	A3	Châu Âu	Hà Nội
51			B344	A3	Châu Âu	TP.HCM
52			A445	A3	Châu Âu	Hà Nội
53			A248	A3	Châu Âu	Hà Nội
54			A305	A4	Đông Á	Hà Nội
55			TEB094	A4	Đông Á	Hà Nội
56			A435	A4	Đông Á	Hà Nội
57			TEB101	A4	Đông Á	Hà Nội
58			TEB020	A4	Đông Á	Hà Nội
59	HPV31	L1	F1022	A	Thái Lan	Hà Nội
60		E6-E7	F1022	A	Thái Lan	Hà Nội
61	HPV33	L1	A424	A1	Braxin	Hà Nội
62			F1214	A1	Braxin	Hà Nội
63			F1341	A1	Braxin	Hà Nội
64		E6-E7	F1341	A1	Costa Rica	Hà Nội
65			F1214	A1	Costa Rica	Hà Nội
66	HPV35	L1	F1218	A1	Rwanda	Hà Nội
67			F1004	A1	Hoa Kỳ	Hà Nội
68		E6-E7	F1218	A1	Thái Lan	Hà Nội

TT	Chủng HPV	Trình tự	Tên mẫu	Dưới dòng	Nguồn gốc	Địa điểm thu thập mẫu
69			F1004	A1	Brukinna Faso, Rwanda, Braxin	Hà Nội
70	HPV52	L1	F1159	A1	Braxin	Hà Nội
71			B151	A1	Braxin, Nhật Bản	TP.HCM
72			B578	C2	Costa Rica	TP.HCM
73			B113	B2	Nhật Bản	TP.HCM
74			A458	B2	Nhật Bản	Hà Nội
75			F1147	B2	Nhật Bản, Thái Lan	Hà Nội
76			B424	B2	Thái Lan	TP.HCM
77			A438	B2	Thái Lan	Hà Nội
78			S1276	B2	Nhật Bản	Hà Nội
79			S1198	B2	Trung Quốc	Hà Nội
80			A557	B2	Nhật Bản	Hà Nội
81			B420	B2	Trung Quốc	TP. HCM
82			A103	B2	Trung Quốc	Hà Nội
83			A424	B2	Trung Quốc	Hà Nội
84			A468	D	Costa Rica	Hà Nội
85		E6-E7	B151	A1	Braxin	TP.HCM
86			F1159	A1	Nhật Bản	Hà Nội
87			S1276	B2	Nhật Bản	Hà Nội
88			B113	B2	Nhật Bản, Thái Lan	TP.HCM
89			S1198	B2	Nhật Bản, Thái Lan	Hà Nội

TT	Chủng HPV	Trình tự	Tên mẫu	Dưới dòng	Nguồn gốc	Địa điểm thu thập mẫu
90			B252	B2	Nhật Bản, Thái Lan	TP.HCM
91			F1147	B2	Nhật Bản	Hà Nội
92			A458	B2	Nhật Bản	Hà Nội
93			B424	B2	Nhật Bản, Thái Lan	TP.HCM
94			B578	B2	Costa Rica	TP.HCM
95			A438	B2	Nhật Bản	Hà Nội
96			A557	B2	Trung Quốc	Hà Nội
97			A424	B2	Thái Lan, Costa Rica	Hà Nội
98			B557	B2	Thái Lan, Costa Rica	TP.HCM
99			B420	B2	Thái Lan, Costa Rica	TP.HCM
100			B422	B2	Thái Lan, Costa Rica	TP.HCM
101			A103	B2	Thái Lan, Costa Rica	Hà Nội
102			B534	B2	Thái Lan, Costa Rica	TP.HCM
103			A468	D	Costa Rica	Hà Nội
104	HPV58	L1	S2442	A1	Đài Loan	T.T.Huế
105			B422	A2	Nhật Bản	TP.HCM
106		E6-E7	S2442	A1	Hongkong, Trung Quốc	
107			B129	A3	Costa Rica	TP.HCM

TT	Chủng HPV	Trình tự	Tên mẫu	Dưới dòng	Nguồn gốc	Địa điểm thu thập mẫu
108			B422	A2	Nhật Bản, Trung Quốc, Hongkong	TP.HCM
109			F1182	A2	Nhật Bản, Trung Quốc, Hongkong	Hà Nội
110	HPV51	L1	A504	A2	Luxembourg	Hà Nội
111			B420	A2	Luxembourg	TP.HCM
112			F1063	A4	Costa Rica, Rwanda...	Hà Nội
113			A407	A4	Thái Lan, Brukin Faso, Rwanda	Hà Nội
114		E6-E7	S2012	A1	Braxin	T.T. Huế
115			B420	A2	Trung Quốc, Costa Rica, Braxin	TP.HCM
116			S1464	A4	Costa Rica, Thái Lan, Brukina Faso	Hà Nội
117			A407	A4	Costa Rica, Thái Lan, Brukina Faso	Hà Nội
118			B129	A4	Costa Rica, Thái Lan, Burukina Faso	TP. HCM
119			F1063	A	Costa Rica	Hà Nội
120	HPV56	L1	S2103	A1	Costa Rica	T.T.Huế
121			B149	A1	Costa Rica	TP. HCM

TT	Chủng HPV	Trình tự	Tên mẫu	Dưới dòng	Nguồn gốc	Địa điểm thu thập mẫu
122			S1056	B	Costa Rica	Hà Nội
123			M1067	B	Luxembourg	Hà Nội
124		E6-E7	S2103	A2	Luxembourg, Braxin, Costa Rica	T.T Huế
125			B149	A2	Luxembourg, Braxin, Costa Rica	TP.HCM
126			M1067	B	Luxembourg	Hà Nội
127			F1071	B	Trung Quốc	Hà Nội
128			S1056	B	Trung Quốc	Hà Nội
129						
129	HPV66	L1	A243	B1	Costa Rica, Nhật Bản	Hà Nội
130			S2222	B1	Costa Rica, Nhật Bản	T.T. Huế
131			B473	B2	Luxembourg	TP.HCM
132			F1127	B2	Costa Rica	Hà Nội
133		E6-E7	S2222	B1	Nhật Bản	T.T. Huế
134			A243	B1	Costa Rica	Hà Nội

Phụ lục 1. 2 Đa dạng di truyền các mẫu HPV giải trình tự gen L1 và E6-E7

TT	Chủng HPV	Tên mẫu	Trình tự	Phân loại Dòng	Phân loại Dưới dòng
1	HPV18	A268	L1	A	A1
			E6-E7		A1
2		TEB052	L1	A	A1
			E6-E7		A1
3		A149	L1	A	A1
			E6-E7		A1
4		F1142	L1	A	A1
			E6-E7		A1
5	HPV39	A456	L1	A	A2
			E6-E7		A2
6		A445	L1	A	A2
			E6-E7		A2
7		S1533	L1	A	A2
			E6-E7		A2
8	HPV59	M1059	L1	A	A1
			E6-E7		A1
9		F1145	L1	B	B
			E6-E7		B
10		F1108	L1	B	B
			E6-E7		B
11	HPV68	F1100	L1	C	C2
			E6-E7		C2
12		A232	L1	C	C2
			E6-E7		C2
13		F1104	L1	C	C2
			E6-E7		C2
14	HPV16	B144	L1	A	A3
			E6-E7		A3
15		B344	L1	A	A3
			E6-E7		A3
16		A412	L1	A	A3
			E6-E7		A3
17		A248	L1	A	A3
			E6-E7		A3
18		A435	L1	A	A4

TT	Chủng HPV	Tên mẫu	Trình tự	Phân loại Dòng	Phân loại Dưới dòng
			E6-E7		A4
19		A305	L1	A	A4
			E6-E7		A4
20		TEB094	L1	A	A4
			E6-E7		A4
21		TEB101	L1	A	A4
			E6-E7		A4
22	HPV31	F1022	L1	A	A
			E6-E7		A
23		F1214	L1	A	A1
			E6-E7		A1
24	HPV33	F1341	L1	A	A1
			E6-E7		A1
25		F1218	L1	A	A1
			E6-E7		A1
26	HPV35	F1004	L1	A	A1
			E6-E7		A1
27		F1159	L1	A	A1
			E6-E7		A1
28		B151	L1	A	A1
			E6E7		A1
29		B578	L1	C	C2
			E6-E7		C2
30		B113	L1	B	B2
			E6-E7		B2
31	HPV52	A458	L1	B	B2
			E6-E7		B2
32		F1147	L1	B	B2
			E6-E7		B2
33		B424	L1	B	B2
			E6-E7		B2
34		A438	L1	B	B2
			E6-E7		B2
35		S1276	L1	B	B2
			E6-E7		B2

TT	Chủng HPV	Tên mẫu	Trình tự	Phân loại Dòng	Phân loại Dưới dòng
36		S1198	L1	B	B2
			E6-E7		B2
37		A557	L1	B	B2
			E6-E7		B2
38		B420	L1	B	B2
			E6-E7		B2
39		A103	L1	B	B2
			E6-E7		B2
40		A424	L1	B	B2
			E6-E7		B2
41		A468	L1	D	D
			E6-E7		D
42	HPV58	S2442	L1	A	A1
			E6-E7		A1
43		B422	L1	A	A2
			E6-E7		A2
44	HPV51	B420	L1	A	A2
			E6-E7		A2
45		F1063	L1	A	A4
			E6-E7		A4
46		A407	L1	A	A4
			E6-E7		A4
47	HPV56	S2103	L1	A	A1
			E6-E7		A2
48		B149	L1	A	A1
			E6-E7		A2
49		S1056	L1	B	B
			E6-E7		B
50		M1067	L1	B	B
			E6-E7		B
51	HPV66	A243	L1	B	B1
			E6-E7		B1
52		S2222	L1	B	B1
			E6-E7		B1

**Phụ lục 1. 3 Danh mục trình tự bộ mồi PGMY09/11 công bố bởi
Tổ chức y tế thế giới (WHO)**

STT	Tên mồi	Trình tự nucleotit của mồi
1	PGMY11-A	GCACAGGGACATAACAATGG
2	PGMY11-B	GCGCAGGGCCACAATAATGG
3	PGMY11-C	GCACAGGGACATAATAATGG
4	PGMY11- D	GCCCAGGGCCACAACAATGG
5	PGMY11-E	GCTCAGGGTTTAAACAATGG
6	PGMY09-F	CGTCCCAAAGGAAACTGATC
7	PGMY09-G	CGACCTAAAGGAAACTGATC
8	PGMY09-H	CGTCCAAAAGGAAACTGATC
9	PGMY09-I	GCCAAGGGGAAACTGATC
10	PGMY09-J	CGTCCCAAAGGATACTGATC
11	PGMY09-K	CGTCCAAGGGGATACTGATC
12	PGMY09-L	CGACCTAAAGGGAATTGATC
13	PGMY09-M	CGACCTAGTGGAAATTGATC
14	PGMY09-N	CGACCAAGGGGATATTGATC
15	PGMY09-P	GCCCAACGGGAAACTGATC
16	PGMY09-Q	CGACCCAAGGGAAACTGGTC
17	PGMY09-R	CGTCCTAAAGGAAACTGGTC
18	HLAdQ-F	GTGGTGTAACCTTGTACCA
19	HLAdQ-R	GGTAGCAGCGGTAGAGTT

Phụ lục 1. 4 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 trong mẫu plasmid HPV18 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV18 từ ngân hàng gen

[Edit Search](#)

[Save Search](#)

[Search Summary](#)

How to read this report?

BLAST Help Videos

Back to Traditional Results Page

Job Title

F1142-HPV18

RID

[EPSF87YD016](#) Search expires on 08-05 14:06 pm [Download All](#)

Program

BLASTN [Citation](#)

Database

nt [See details](#)

Query ID

lcl|Query_58413

Description

F1142-HPV18

Molecule type

dna

Query Length

858

Other reports

[Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[Add organism](#)

Percent Identity

E value

Query Coverage

to

to

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Human papillomavirus type 18 K1872 DNA, complete genome	Human papilloma...	1585	1585	100%	0.0	100.00%	7857	LC509006.1
☒	Human papillomavirus type 18 K1385 DNA, complete genome	Human papilloma...	1585	1585	100%	0.0	100.00%	7857	LC509003.1
☒	Human papillomavirus type 18 TK032 DNA, complete genome	Human papilloma...	1585	1585	100%	0.0	100.00%	7857	LC509001.1
☒	Human papillomavirus type 18 K1929 DNA, complete genome	Human papilloma...	1585	1585	100%	0.0	100.00%	7857	LC508999.1
☒	Human papillomavirus type 18 K1506 DNA, complete genome	Human papilloma...	1585	1585	100%	0.0	100.00%	7857	LC508998.1
☒	Human papillomavirus type 18 K1092 DNA, complete genome	Human papilloma...	1585	1585	100%	0.0	100.00%	7857	LC508996.1
☒	Human papillomavirus type 18 K0280 DNA, complete genome	Human papilloma...	1585	1585	100%	0.0	100.00%	7857	LC508993.1

Phụ lục 1. 5 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV39 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV39 từ ngân hàng gen

Job TitleS2472-HPV39

RIDCZN5X3ZB013Search expires on 07-15 16:33 pmDownload All

ProgramBLASTNCitation

DatabasentSee details

Query IDIc|Query_46593

DescriptionNone

Molecule typedna

Query Length748

Other reportsDistance tree of resultsMSA viewer

Filter Results

Organismonly top 20 will appearexclude

Type common name, binomial, taxid or group name

Add organism

Percent IdentityE valueQuery Coverage

to to to

FilterReset

DescriptionsGraphic SummaryAlignmentsTaxonomy

Sequences producing significant alignmentsDownloadSelect columnsShow100?

select all100 sequences selected

GenBankGraphicsDistance tree of resultsMSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
	Human papillomavirus type 39 isolate As093_complete genome	human papilloma...	1382	1382	100%	0.0	100.00%	7860	KC470244.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Tw562_complete genome	human papilloma...	1382	1382	100%	0.0	100.00%	7860	KC470243.1
	Human papillomavirus 39 isolate 16B_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7828	KX514417.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Qv25609_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7860	KC470242.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Qv25984_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7860	KC470241.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Qv21219_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7860	KC470239.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Qv27715_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7833	KC470237.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Qv29509_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7885	KC470236.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Qv31864_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7833	KC470235.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Qv29778_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7833	KC470234.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Qv29613_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7833	KC470233.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Qv18075_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7833	KC470232.1
	Human papillomavirus type 39 isolate Qv28005_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7833	KC470231.1
	Human papillomavirus type 39 isolate LNS9068892_HPV39_complete genome	human papilloma...	1371	1371	100%	0.0	99.73%	7833	LR862071.1

Phụ lục 1. 6 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV45 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV45 từ ngân hàng gen

(Một phần của vector trong trình tự thu được đã được loại bỏ tự động khi so sánh với các chủng từ ngân hàng gen)

Job Title

S1344-HPV45

RID

[CZM1C9J0016](#)
Search expires on 07-15 16:30 pm
[Download All](#)

Program

BLASTN [Citation](#)

Database

nt [See details](#)

Query ID

lc|Query_35617

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

996

Other reports

[Distance tree of results](#)
[MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

[+ Add organism](#)

Percent Identity

to

E value

to

Query Coverage

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

[Download](#)
[Select columns](#)
Show 100

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)
[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Human papillomavirus type 45 isolate 61.411 E6 (E6) and E7 (E7) genes, complete cds	human papillomav...	1764	1764	97%	0.0	99.38%	1050	JQ976829.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate Qv34163, complete genome	human papillomav...	1753	1753	97%	0.0	99.18%	7849	KC470260.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate Qv30712, complete genome	human papillomav...	1753	1753	97%	0.0	99.18%	7849	KC470259.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate RW46, complete genome	human papillomav...	1753	1753	97%	0.0	99.18%	7849	KC470258.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate 61.511 E6 (E6) and E7 (E7) genes, complete cds	human papillomav...	1753	1753	97%	0.0	99.18%	1050	JQ976830.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate LNS0599800 HPV45, complete genome	human papillomav...	1753	1753	97%	0.0	99.18%	7849	LR861941.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate Qv31748, complete genome	human papillomav...	1753	1753	97%	0.0	99.18%	7849	EF202167.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate Qv25000, complete genome	human papillomav...	1753	1753	97%	0.0	99.18%	7849	EF202164.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate 61.191 E6 (E6) and E7 (E7) genes, complete cds	human papillomav...	1748	1748	97%	0.0	99.08%	1050	JQ976828.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate 52.201 E6 (E6) and E7 (E7) genes, complete cds	human papillomav...	1748	1748	97%	0.0	99.08%	1050	JQ976819.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate Qv31035, complete genome	human papillomav...	1748	1748	97%	0.0	99.08%	7849	EF202166.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate 11.311 E6 (E6) and E7 (E7) genes, complete cds	human papillomav...	1742	1742	97%	0.0	98.97%	1050	JQ976790.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate 11.121 E6 (E6) and E7 (E7) genes, complete cds	human papillomav...	1742	1742	97%	0.0	98.97%	1050	JQ976789.1
☒	Human papillomavirus type 45 isolate Qv26351, complete genome	human papillomav...	1742	1742	97%	0.0	98.97%	7849	EF202165.1

Phụ lục 1. 7 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV59 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV59 từ ngân hàng gen

Job TitleM1059-HPV59

RIDCZMEW3PG013

Search expires on 07-15 16:20 pm

Download All

ProgramBLASTN

Citation

Databasent

See details

Query IDlclQuery_38411

DescriptionNone

Molecule typedna

Query Length781

Other reports

Distance tree of results

MSA viewer

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

Type common name, binomial, taxid or group name

Add organism

Percent Identity

E value

Query Coverage

tototo

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show100

select all

27 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Human papillomavirus type 59 isolate LNS7199256 HPV59 complete genome	human papillomavirus 59	1437	1437	100%	0.0	99.87%	7913	LR862007.1
☒	Human papilloma virus type 59 complete viral genome	human papillomavirus 59	1437	1437	100%	0.0	99.87%	7896	X77858.1
☒	Human papillomavirus type 59 isolate Qv00231 complete genome	human papillomavirus 59	1432	1432	100%	0.0	99.74%	7898	KC470262.1
☒	Human papillomavirus type 59 isolate Qv25652 complete genome	human papillomavirus 59	1426	1426	100%	0.0	99.62%	7898	KC470261.1
☒	Human papillomavirus type 59 isolate LZod68-59 complete genome	human papillomavirus 59	1426	1426	100%	0.0	99.62%	7897	EU918767.1
☒	Human papillomavirus type 59 isolate Qv23880 complete genome	human papillomavirus 59	1410	1410	100%	0.0	99.23%	7897	KC470263.1
☒	Human papillomavirus type 59 isolate LNS5649440 HPV59 complete genome	human papillomavirus 59	1410	1410	100%	0.0	99.23%	7898	LR861926.1
☒	Human papillomavirus 59 isolate 32A.59 complete genome	human papillomavirus 59	1404	1404	100%	0.0	99.10%	7898	KU298921.1
☒	Human papillomavirus type 59 isolate Qv25808 complete genome	human papillomavirus 59	1404	1404	100%	0.0	99.10%	7898	KC470264.1
☒	Human papillomavirus type 59 isolate LNS9786324 HPV59 complete genome	human papillomavirus 59	1404	1404	100%	0.0	99.10%	7898	LR862080.1
☒	Human papillomavirus type 59 isolate LNS6249536 HPV59 complete genome	human papillomavirus 59	1404	1404	100%	0.0	99.10%	7898	LR861981.1
☒	Human papillomavirus type 59 isolate LNS6048641 HPV59 complete genome	human papillomavirus 59	1404	1404	100%	0.0	99.10%	7898	LR861974.1
☒	Human papillomavirus type 59 isolate LNS0754030 HPV59 complete genome	human papillomavirus 59	1404	1404	100%	0.0	99.10%	7898	LR861945.1

Phụ lục 1. 8 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV68 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV68 từ ngân hàng gen

Job Title

F1104-HPV68

RID

CZMTM72X013

Search expires on 07-15 16:26 pm

Download All

Program

BLASTN

Citation

Database

nt

See details

Query ID

Ic|Query_52051

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

851

Other reports

Distance tree of results

MSA viewer

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

Add organism

Percent Identity

E value

Query Coverage

to

to

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

☒ select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Human papillomavirus type 68 isolate Qv19111_complete genome	human papilloma...	1567	1567	100%	0.0	99.88%	7836	KC470273.1
☒	Human papillomavirus 68 isolate 83B_68_complete genome	human papilloma...	1561	1561	100%	0.0	99.76%	7836	KU298932.1
☒	Human papillomavirus 68 isolate 83A_68_partial genome	human papilloma...	1561	1561	100%	0.0	99.76%	7827	KU298931.1
☒	Human papillomavirus type 68 isolate LZod68-68_complete genome	human papilloma...	1561	1561	100%	0.0	99.76%	7834	EU918769.1
☒	Human papillomavirus type 68 isolate Qv33015_complete genome	human papilloma...	1555	1555	99%	0.0	99.76%	7836	KC470274.1
☒	Human papillomavirus type 68 isolate Qv24962_complete genome	human papilloma...	1555	1555	100%	0.0	99.65%	7836	KC470272.1
☒	Human papillomavirus type 68b_complete genome	Human papilloma...	1555	1555	100%	0.0	99.65%	7836	FR751039.1
☒	Human papillomavirus 68 isolate 268_complete genome	human papilloma...	1548	1548	100%	0.0	99.53%	7817	KX514428.1
☒	Human papillomavirus type 68b DNA integrated into human chromosome 18	Human papilloma...	1544	3084	100%	0.0	99.41%	13286	FR751040.1
☒	Human papillomavirus 68 isolate 295_complete genome	human papilloma...	1543	1543	100%	0.0	99.41%	7809	KX514431.1
☒	Human cellular DNA/Human papillomavirus proviral DNA	Human papilloma...	1539	1539	100%	0.0	99.29%	6042	M73258.1
☒	Human papillomavirus type 68 isolate Rv626_complete genome	human papilloma...	1511	1511	100%	0.0	98.71%	7838	KC470281.1
☒	Human papillomavirus type 68 isolate Qv00677_complete genome	human papilloma...	1511	1511	100%	0.0	98.71%	7830	KC470275.1

Phụ lục 1. 9 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV16 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV16 từ ngân hàng gen
(Một phần của vector trong trình tự thu được đã được loại bỏ tự động khi so sánh với các chủng từ ngân hàng gen)

Job Title

A248-HPV16

RID

CZMJE14G016

Search expires on 07-15 16:22 pm

Download All

Program

BLASTN

Citation

Database

nt

See details

Query ID

lcl|Query_57325

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

968

Other reports

Distance tree of results

MSA viewer

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity

E value

Query Coverage

to

to

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Human papillomavirus type 16 SW063 genomic DNA, complete genome	Human papillomavirus type 16	1618	1618	90%	0.0	100.00%	7905	LC511106.1
Human papillomavirus type 16 DNA, complete genome, isolate: JPD169	Human papillomavirus type 16	1618	1618	90%	0.0	100.00%	7905	AB889494.1
Human papillomavirus type 16 isolate AS411, complete genome	Human papillomavirus type 16	1618	1618	90%	0.0	100.00%	7905	HQ644236.1
Human papillomavirus type 16 TK0141 DNA, complete genome	Human papillomavirus type 16	1613	1613	90%	0.0	99.89%	7905	LC456632.1
Human papillomavirus type 16 isolate NCI_244882, partial genome	Human papillomavirus type 16	1613	1613	90%	0.0	99.89%	7902	MG850178.1
Human papillomavirus type 16 isolate NCI_291774, partial genome	Human papillomavirus type 16	1609	1609	90%	0.0	99.77%	7900	MG850735.1
Human papillomavirus type 16 isolate NCI_205712, partial genome	Human papillomavirus type 16	1609	1609	90%	0.0	99.77%	7901	MG849643.1
Human papillomavirus type 16 K1931 DNA, complete genome	Human papillomavirus type 16	1607	1607	90%	0.0	99.77%	7906	LC456637.1
Human papillomavirus type 16 K1332 genomic DNA, complete genome	Human papillomavirus type 16	1607	1607	90%	0.0	99.77%	7966	LC456187.1
Human papillomavirus type 16 isolate HN-LU-SCC-26, complete genome	Human papillomavirus type 16	1607	1607	90%	0.0	99.77%	7904	KY994539.1
Human papillomavirus type 16 K1099 genomic DNA, complete genome	Human papillomavirus type 16	1607	1607	90%	0.0	99.77%	7905	LC368983.1
Human papillomavirus type 16 K1608 genomic DNA, complete genome	Human papillomavirus type 16	1607	1607	90%	0.0	99.77%	7906	LC368980.1
Human papillomavirus type 16 TK053 genomic DNA, complete genome	Human papillomavirus type 16	1607	1607	90%	0.0	99.77%	7906	LC368977.1

Phụ lục 1.10 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV31 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV31 từ ngân hàng gen
(Một phần của vector trong trình tự thu được đã được loại bỏ tự động khi so sánh với các chủng từ ngân hàng gen)

Job Title

F1022-HPV31

RID

CZMPDFC8016

Search expires on 07-15 16:24 pm

Download All

Program

BLASTN

Citation

Database

nt

See details

Query ID

lcl|Query_43461

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

830

Other reports

Distance tree of results

MSA viewer

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity

E value

Query Coverage

to

to

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100 ?									
☒ select all 100 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP295389, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752528.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP291328, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752485.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP289982, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752469.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP285116, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752426.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP282146, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752405.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP281501, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752403.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP280319, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752398.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP270479, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752312.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP266274, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752279.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP264586, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752266.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP253269, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752184.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP246507, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752136.1
☒	Human papillomavirus 31 isolate PAP242490, partial genome	human papillomavirus 31	1487	1487	96%	0.0	100.00%	7912	MT752107.1

Phụ lục 1. 3 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV33 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV33 từ ngân hàng gen
(Một phần của vector trong trình tự thu được đã được loại bỏ tự động khi so sánh với các chủng từ ngân hàng gen)

Job Title

F1214-HPV33

RID

[CZMXGXUV01R](#)
Search expires on 07-15 16:28 pm
[Download All](#)

Program

BLASTN [Citation](#)

Database

nt [See details](#)

Query ID

lc|Query_196523

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

913

Other reports

[Distance tree of results](#)
[MSA viewer](#)

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity

to

E value

to

Query Coverage

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

☒ select all
100 sequences selected

[GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)
[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Human papillomavirus 33 isolate 65B.33. complete genome	human papillomav...	1563	1563	93%	0.0	99.65%	7909	KU298892.1
☒	Human papillomavirus 33 isolate 65A.33. complete genome	human papillomav...	1563	1563	93%	0.0	99.65%	7909	KU298891.1
☒	Human papillomavirus type 33 isolate LNS9453833_HPV33. complete genome	human papillomav...	1563	1563	93%	0.0	99.65%	7911	LR862077.1
☒	Human papillomavirus type 33 isolate RW926. complete genome	human papillomav...	1563	1563	93%	0.0	99.65%	7909	HQ537694.1
☒	Human papillomavirus type 33 isolate Z84. complete genome	human papillomav...	1563	1563	93%	0.0	99.65%	7909	HQ537693.1
☒	Human papillomavirus type 33 isolate RW702. complete genome	human papillomav...	1563	1563	93%	0.0	99.65%	7909	HQ537692.1
☒	Human papillomavirus type 33 isolate BF266. complete genome	human papillomav...	1563	1563	93%	0.0	99.65%	7909	HQ537691.1
☒	Human papillomavirus type 33 isolate Qv22751. complete genome	human papillomav...	1563	1563	93%	0.0	99.65%	7912	HQ537689.1
☒	Human papillomavirus type 33 isolate Qv32494. complete genome	human papillomav...	1563	1563	93%	0.0	99.65%	7910	HQ537688.1
☒	Human papillomavirus 33 isolate 65C.33. complete genome	human papillomav...	1559	1559	93%	0.0	99.53%	7909	KU298893.1
☒	Human papillomavirus type 33 isolate S10341 E6 (E6) and E7 (E7) genes. complete cds	human papillomav...	1557	1557	93%	0.0	99.53%	1050	JQ976760.1
☒	Human papillomavirus type 33 isolate Qv35834. complete genome	human papillomav...	1557	1557	93%	0.0	99.53%	7912	HQ537690.1
☒	Human papillomavirus type 33. complete genome	human papillomav...	1557	1557	93%	0.0	99.53%	7909	M12732.1

Phụ lục 1. 4 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV35 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV35 từ ngân hàng gen

Job TitleF1004-HPV35

RIDCZMNNR3R013

Search expires on 07-15 16:24 pm

Download All

ProgramBLASTN

Citation

Databasent

See details

Query IDlcl|Query_10287

DescriptionNone

Molecule typedna

Query Length890

Other reports

Distance tree of results

MSA viewer

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

Type common name, binomial, taxid or group name

Add organism

Percent Identity

E value

Query Coverage

tototo

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show100

select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP290660, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217985.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP284314, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217966.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP264803, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217918.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP250643, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217891.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP169942, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217695.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP154770, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217641.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP134891, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217585.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP132213, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217583.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP131130, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217580.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP113276, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217533.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate PAP105663, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217513.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate IARC366099RW, partial genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217497.1
☒	Human papillomavirus 35 isolate IARC1220972CH, complete genome	human papillomavirus 35	1644	1644	100%	0.0	100.00%	7879	MT217488.1

Phụ lục 1. 13 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV52 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV52 từ ngân hàng gen

Job Title

F1147-HPV52

RID

CZMUKM4Z016

Search expires on 07-15 16:26 pm

Download All

Program

BLASTN

Citation

Database

nt

See details

Query ID

Id|Query_5483

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

812

Other reports

Distance tree of results

MSA viewer

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity

E value

Query Coverage

to

to

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

☒ select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Human papillomavirus type 52 TK094 DNA, complete genome	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7960	LC373207.1
☒	Human papillomavirus type 52 SW012 DNA, complete genome	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7960	LC373205.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: TK051	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7960	LC270075.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: K1009	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7960	LC270073.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: K0934	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7960	LC270072.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: K0703	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7960	LC270069.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: K0048	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7960	LC270067.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: K0034	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7921	LC270066.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: TK119	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7924	LC270065.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: K0497	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7960	LC270064.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: K0422	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7960	LC270062.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: K0273	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7903	LC270061.1
☒	Human papillomavirus type 52 DNA, complete genome, isolate: K0197	human papillomavirus 52	1495	1495	100%	0.0	99.88%	7960	LC270060.1

Phụ lục 1. 5 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV58 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV58 từ ngân hàng gen
(Một phần của vector trong trình tự thu được đã được loại bỏ tự động khi so sánh với các chủng từ ngân hàng gen).

[Edit Search](#)
[Save Search](#)
[Search Summary](#)
[How to read this report?](#)
[BLAST Help Videos](#)
[Back to Traditional Results Page](#)

Job Title F1182-HPV58
RID [CZKMVR2V016](#) Search expires on 07-15 16:06 pm
[Download All](#)
Program BLASTN [Citation](#)
Database nt [See details](#)
Query ID lc|Query_64429
Description None
Molecule type dna
Query Length 789
Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results
Organism only top 20 will appear ☐ exclude

[Add organism](#)
Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to
[Filter](#) [Reset](#)

[Descriptions](#)
[Graphic Summary](#)
[Alignments](#)
[Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments
[Download](#)
[Select columns](#)
[Show](#) 100 [?](#)

☒ select all 100 sequences selected
 [GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)
[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Human papillomavirus 58 isolate 58CNTZ18 E6 protein (E6) and E7 protein (E7) genes, complete cds	human papillomav...	1223	1223	84%	0.0	99.85%	761	MH348935.1
☒	Human papillomavirus type 58 CINJ3 DNA, complete genome	human papillomav...	1223	1223	84%	0.0	99.85%	7824	LC376008.1
☒	Human papillomavirus type 58 SIW007 DNA, complete genome	human papillomav...	1223	1223	84%	0.0	99.85%	7824	LC373210.1
☒	Human papillomavirus type 58 SIW006 DNA, complete genome	human papillomav...	1223	1223	84%	0.0	99.85%	7824	LC373209.1
☒	Human papillomavirus type 58 SIW003 DNA, complete genome	human papillomav...	1223	1223	84%	0.0	99.85%	7824	LC373208.1
☒	Human papillomavirus 58 isolate QE01538, complete genome	human papillomav...	1223	1223	84%	0.0	99.85%	7824	KY225934.1
☒	Human papillomavirus 58 isolate KORK00053, complete genome	human papillomav...	1223	1223	84%	0.0	99.85%	7824	KY225929.1
☒	Human papillomavirus 58 isolate KORK00643, complete genome	human papillomav...	1223	1223	84%	0.0	99.85%	7824	KY225928.1
☒	Human papillomavirus 58 isolate KORK00038, complete genome	human papillomav...	1223	1223	84%	0.0	99.85%	7824	KY225927.1
☒	Human papillomavirus 58 isolate KORK00020, complete genome	human papillomav...	1223	1223	84%	0.0	99.85%	7824	KY225926.1

Phụ lục 1. 6 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV51 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV51 từ ngân hàng gen

Job TitleS1464-HPV51

RIDCZN29J6E013Search expires on 07-15 16:31 pmDownload All

ProgramBLASTNCitation

DatabasentSee details

Query IDlclQuery_27195

DescriptionNone

Molecule typedna

Query Length768

Other reportsDistance tree of resultsMSA viewer

Filter Results

Organismonly top 20 will appearexclude

Type common name, binomial, taxid or group name

Add organism

Percent IdentityE valueQuery Coverage

to to to

FilterReset

DescriptionsGraphic SummaryAlignmentsTaxonomy

Sequences producing significant alignmentsDownloadSelect columnsShow100

select all100 sequences selected

GenBankGraphicsDistance tree of resultsMSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Human papillomavirus 51 isolate Qv09427, complete genome	human papillomavirus 51	1419	1419	100%	0.0	100.00%	7811	KF436875.1
Human papillomavirus 51 isolate BF375, complete genome	human papillomavirus 51	1417	1417	99%	0.0	100.00%	7812	KF436877.1
Human papillomavirus 51 isolate INJP06447, complete genome	human papillomavirus 51	1417	1417	99%	0.0	100.00%	7812	KF436876.1
Human papillomavirus 51 isolate RW20, complete genome	human papillomavirus 51	1408	1408	100%	0.0	99.74%	7811	KF436872.1
Human papillomavirus 51 isolate 108B, complete genome	human papillomavirus 51	1402	1402	100%	0.0	99.61%	7760	KJ514432.1
Human papillomavirus 51 isolate 118A.51, complete genome	human papillomavirus 51	1402	1402	100%	0.0	99.61%	7811	KU298905.1
Human papillomavirus 51 isolate 34C.51, complete genome	human papillomavirus 51	1402	1402	100%	0.0	99.61%	7811	KU298904.1
Human papillomavirus 51 isolate 34B.51, complete genome	human papillomavirus 51	1402	1402	100%	0.0	99.61%	7792	KU298903.1
Human papillomavirus 51 isolate 34A.51, complete genome	human papillomavirus 51	1402	1402	100%	0.0	99.61%	7794	KU298902.1
Human papillomavirus 51 isolate HPV51-155-24, complete genome	human papillomavirus 51	1402	1402	100%	0.0	99.61%	7812	KT725857.1
Human papillomavirus 51 isolate Qv00891, complete genome	human papillomavirus 51	1402	1402	100%	0.0	99.61%	7813	KF436870.1
Human papillomavirus 51 isolate Rw95, complete genome	human papillomavirus 51	1402	1402	100%	0.0	99.61%	7811	KF436869.1
Human papillomavirus 51 isolate Qv23639, complete genome	human papillomavirus 51	1402	1402	100%	0.0	99.61%	7811	KF436868.1
Human papillomavirus 51 isolate Qv34180, complete genome	human papillomavirus 51	1402	1402	100%	0.0	99.61%	7811	KF436867.1

Phụ lục 1. 7 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV56 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV56 từ ngân hàng gen

(Một phần của vector trong trình tự thu được đã được loại bỏ tự động khi so sánh với các chủng từ ngân hàng gen)

Job Title **S1056-HPV56**

RID [CZMYGUB901R](#) Search expires on 07-15 16:29 pm
[Download All](#) ▼

Program BLASTN [?](#) [Citation](#) ▼

Database nt [See details](#) ▼

Query ID lc|Query_375031

Description None

Molecule type dna

Query Length 901

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
	Human papillomavirus 56 strain kyd-s0256_complete genome	human papillomavirus 56	1559	1559	93%	0.0	100.00%	7825	MT783416.1
	Human papillomavirus type 56 isolate LNS9880271 HPV56_complete genome	human papillomavirus 56	1554	1554	93%	0.0	99.88%	7866	LR862083.1
	Human papillomavirus type 56 isolate LNS7888703 HPV56_complete genome	human papillomavirus 56	1554	1554	93%	0.0	99.88%	7866	LR862043.1
	Human papillomavirus type 56 isolate LNS1681993 HPV56_complete genome	human papillomavirus 56	1554	1554	93%	0.0	99.88%	7865	LR861962.1
	Human papillomavirus type 56 isolate LNS1302764 HPV56_complete genome	human papillomavirus 56	1554	1554	93%	0.0	99.88%	7866	LR861955.1
	Human papillomavirus type 56 isolate LNS3774660 HPV56_complete genome	human papillomavirus 56	1554	1554	93%	0.0	99.88%	7866	LR861877.1
	Human papillomavirus type 56 isolate LNS2917513 HPV56_complete genome	human papillomavirus 56	1554	1554	93%	0.0	99.88%	7866	LR861859.1
	Human papillomavirus type 56 clone Qv26762_complete genome	human papillomavirus 56	1554	1554	93%	0.0	99.88%	7866	EF177176.1
	Human papillomavirus type 56 isolate LNS6178203 HPV56_complete genome	human papillomavirus 56	1548	1548	93%	0.0	99.76%	7866	LR861979.1
	Human papillomavirus type 56 clone Qv26342_complete genome	human papillomavirus 56	1548	1548	93%	0.0	99.76%	7866	EF177177.1
	Human papillomavirus type 56 isolate LNS6249536 HPV56_complete genome	human papillomavirus 56	1528	1528	93%	0.0	99.41%	7845	LR861980.1
	Human papillomavirus type 56 clone Qv24970_complete genome	human papillomavirus 56	1528	1528	93%	0.0	99.41%	7845	EF177180.1
	Human papillomavirus type 56 genomic DNA	human papillomavirus 56	1528	1528	93%	0.0	99.41%	7844	X74483.1

Phụ lục 1. 17 Độ tương đồng của đoạn gen E6-E7 mẫu plasmid HPV66 tái tổ hợp so với đoạn gen trên các chủng HPV66 từ ngân hàng gen
(Một phần của vector trong trình tự thu được đã được loại bỏ tự động khi so sánh với các chủng từ ngân hàng gen)

Job Title

S2222-HPV66

RID

CZN55JHN013

Search expires on 07-15 16:32 pm

Download All

Program

BLASTN

Citation

Database

nt

See details

Query ID

Ic|Query_50505

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

860

Other reports

Distance tree of results

MSA viewer

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity

E value

Query Coverage

to

to

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Human papillomavirus type 66 TK130 DNA complete genome	human papilloma...	1530	1530	96%	0.0	99.76%	7818	LC511686.1
☒	Human papillomavirus type 66 clone Qv26740 complete genome	human papilloma...	1530	1530	96%	0.0	99.76%	7818	EF177183.1
☒	Human papillomavirus type 66 clone Qv25111 complete genome	human papilloma...	1524	1524	96%	0.0	99.64%	7816	EF177188.1
☒	Human papillomavirus type 66 isolate LNS1839688 HPV66 complete genome	human papilloma...	1502	1502	96%	0.0	99.16%	7816	LR861964.1
☒	Human papillomavirus type 66 isolate LNS2720744 HPV66 complete genome	human papilloma...	1502	1502	96%	0.0	99.16%	7816	LR861851.1
☒	Human papillomavirus type 66 clone Qv24220 complete genome	human papilloma...	1502	1502	96%	0.0	99.16%	7816	EF177189.1
☒	Human papillomavirus type 66 clone Qv35854 complete genome	human papilloma...	1502	1502	96%	0.0	99.16%	7816	EF177182.1
☒	Human papillomavirus type 66 isolate LNS9786324 HPV66 complete genome	human papilloma...	1496	1496	96%	0.0	99.04%	7816	LR862081.1
☒	Human papillomavirus type 66 isolate LNS7888703 HPV66 complete genome	human papilloma...	1496	1496	96%	0.0	99.04%	7816	LR862042.1
☒	Human papillomavirus type 66 isolate LNS3785675 HPV66 complete genome	human papilloma...	1496	1496	96%	0.0	99.04%	7816	LR861879.1
☒	Human papillomavirus type 66 clone Qv218 complete genome	human papilloma...	1496	1496	96%	0.0	99.04%	7816	EF177191.1
☒	Human papillomavirus type 66 clone Qv11088 complete genome	human papilloma...	1496	1496	96%	0.0	99.04%	7816	EF177190.1
☒	Human papillomavirus type 66 clone Qv25260 complete genome	human papilloma...	1496	1496	96%	0.0	99.04%	7816	EF177187.1
☒	Human papillomavirus type 66 isolate LNS0208569 HPV66 complete genome	human papilloma...	1491	1491	96%	0.0	98.92%	7816	LR861840.1

PHỤ LỤC 2

Phụ lục 2. 1 Kết quả kiểm tra độ ổn định Bộ mẫu chuẩn

TT	Tên bộ mẫu	Thành phần và đặc tính	Phương pháp đánh giá	Kết quả cần đạt
1	Panel mẫu chuẩn xác định độ nhạy phân tích	14 mẫu HPV plasmid dương tính với 14 týp	Đối với mỗi HPV plasmid, đánh giá giá trị Ct tại T12* tháng và so sánh với T0 của plasmid có nồng độ 10^6 bản sao/ μ l, lặp lại 2 lần	Kết quả Ct của nồng độ plasmid gốc thay đổi ≤ 2 giữa T0 và T12 tháng
2	Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ đặc hiệu phân tích	10 mẫu âm tính với 14 týp HPV	Xác định týp 10 mẫu ở T0 và T12 tháng, lặp lại 2 lần	Đặc tính (HPV týp) của mẫu không thay đổi giữa T0 và T12
3	Panel mẫu chuẩn xác định độ nhạy lâm sàng	60 mẫu lâm sàng dương tính với 14 týp HPV	Xác định týp 60 mẫu ở T0 và T12 tháng, lặp lại 2 lần	Đặc tính (HPV týp) của mẫu không thay đổi giữa T0 và T12
4	Panel mẫu chuẩn HPV xác định độ đặc hiệu lâm sàng	103 mẫu lâm sàng âm tính với 14 týp HPV	Đánh giá 20% số mẫu chứng nội kiểm IC giữa T0 và T12, lặp lại 2 lần	20 mẫu chọn ngẫu nhiên có kết quả âm tính với 14 týp HPV ở T0 và T12 tháng, trong khi giá trị Ct của chứng nội kiểm IC thay đổi ≤ 3
5	Panel mẫu xác định độ chính xác	14 mẫu HPV plasmid dương tính trộn với mẫu	Mỗi mẫu HPV plasmid (10^6 bản sao/ μ l) trộn với mẫu lâm sàng âm tính gồm các nồng độ	Nồng độ plasmid các mẫu dương tính thay đổi ≤ 2 giá trị Ct giữa T0 và T12 tháng

TT	Tên bộ mẫu	Thành phần và đặc tính	Phương pháp đánh giá	Kết quả cần đạt
		lâm sàng âm tính gồm 4 nồng độ khác nhau mẫu dương cao, trung bình, thấp và mẫu âm tính	cao, trung bình, thấp, và âm tính ở thời điểm T0 và T12. Đánh giá giá trị Ct của các mẫu dương tính và xác định đặc tính mẫu của mỗi mẫu, lặp lại 2 lần	Đặc tính (HPV týp) của mẫu tại 4 nồng độ cao, trung bình, thấp và âm tính không thay đổi

(*) T0: 0 tháng; T12: 12 tháng

**Phụ lục 2. 2 Kết quả kiểm tra độ ổn định của Panel mẫu chuẩn xác định độ
nhạy phân tích tại thời điểm 0 tháng (T0) và 12 tháng (T12)**

TT	Týp HPV	Số bản sao/ μ l	Giá trị Ct tại T0			Giá trị Ct tại T12			SD
			Lần 1	Lần 2	Ct TB*	Lần 1	Lần 2	Ct TB	
1	HPV 16	10000	17,96	17,79	17,87	18,14	17,98	18,06	0,12
2	HPV 18	10000	16,59	16,39	16,49	17,08	16,92	17,00	0,26
3	HPV 31	10000	14,99	16,00	15,49	15,92	16,12	16,02	0,27
4	HPV 33	10000	15,79	15,19	15,49	17,65	17,19	17,42	0,98
5	HPV 35	10000	17,86	18,59	18,22	18,11	18,42	18,26	0,13
6	HPV 39	10000	18,14	18,30	18,22	18,50	18,52	18,51	0,15
7	HPV 45	10000	16,14	17,97	17,06	17,67	17,11	17,39	0,28
8	HPV 51	10000	16,99	17,06	17,02	17,34	17,12	17,23	0,14
9	HPV 52	10000	17,68	17,92	17,80	18,18	17,96	18,07	0,16
10	HPV 56	10000	17,16	16,46	16,81	17,19	17,25	17,22	0,21
11	HPV 58	10000	15,29	15,37	15,33	16,76	17,37	17,06	0,90
12	HPV 59	10000	16,47	16,44	16,45	16,10	16,93	16,52	0,34
13	HPV 66	10000	16,33	16,39	16,36	16,38	16,30	16,34	0,04
14	HPV 68	10000	16,11	16,23	16,17	16,41	16,57	16,49	0,17

Ghi chú: Mẫu chuẩn (10^6 bản sao/ μ l) pha loãng 1:100 trước khi kiểm tra

(*) TB: trung bình

Phụ lục 2. 3 Kết quả kiểm tra độ ổn định của Panel mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu phân tích tại thời điểm 0 tháng (T0) và 12 tháng (T12)

T T	Tên mẫu	Định tít tại T0		Định tít tại T12	
		Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2
1	N211 01	Âm tính* DT HPV 53	Âm tính DT HPV 53	Âm tính DT HPV 53	Âm tính DT HPV 53
2	N211 02	Âm tính DT HPV 61	Âm tính DT HPV 61	Âm tính DT HPV 61	Âm tính DT HPV 61
3	N211 03	Âm tính DT HPV 70	Âm tính DT HPV 70	Âm tính DT HPV 70	Âm tính DT HPV 70
4	N211 04	Âm tính DT HPV 54/55;84/26	Âm tính DT HPV 54/55;84/26	Âm tính DT HPV 54/55;84/26	Âm tính DT HPV 54/55;84/26
5	N211 05	Âm tính DT HPV 43/44	Âm tính DT HPV 43/44	Âm tính DT HPV 43/44	Âm tính DT HPV 43/44
6	N211 06	Âm tính DT HPV 40/61; 81	Âm tính DT HPV 40/61; 81	Âm tính DT HPV 40/61; 81	Âm tính DT HPV 40/61; 81
7	N211 07	Âm tính DT HPV 40/61; 57/71	Âm tính DT HPV 40/61; 57/71	Âm tính DT HPV 40/61; 57/71	Âm tính DT HPV 40/61; 57/71
8	N211 08	Âm tính DT HPV 42; 84/26	Âm tính DT HPV 42; 84/26	Âm tính DT HPV 42; 84/26	Âm tính DT HPV 42; 84/26
9	N211 09	Âm tính DT HPV 81	Âm tính DT HPV 81	Âm tính DT HPV 81	Âm tính DT HPV 81
1 0	N211 10	Âm tính DT HPV 82	Âm tính DT HPV 82	Âm tính DT HPV 82	Âm tính DT HPV 82

(*): Âm tính với 14 tít HPV nguy cơ cao, DT: dương tính

**Phụ lục 2. 4 Kết quả kiểm tra độ ổn định của Panel mẫu chuẩn xác định độ
nhảy lâm sàng tại thời điểm 0 tháng (T0) và 12 tháng (T12)**

ST T	Tên mẫu	Định týp tại T0		Định týp tại T12	
		Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2
1	N21101	HPV 18;51*	HPV 18;51	HPV 18;51	HPV 18;51
2	N21102	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16
3	N21103	18;51	18;51	18;51	18;51
4	N21104	HPV16;18;51; 52;58	HPV16;18;51; 52;58	HPV16;18;51; 52;58	HPV16;18;51; 52;58
5	N21105	HPV 16;31;59	HPV 16;31;59	HPV 16;31;59	HPV 16;31;59
6	N21106	HPV 16;51;56	HPV 16;51;56	HPV 16;51;56	HPV 16;51;56
7	N21107	HPV 18;51	HPV 18;51	HPV 18;51	HPV 18;51
8	N21108	HPV 16;59	HPV 16;59	HPV 16;59	HPV 16;59
9	N21109	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16
10	N21110	HPV 16;18;56	HPV 16;18;56	HPV 16;18;56	HPV 16;18;56
11	N21111	HPV 16;18	HPV 16;18	HPV 16;18	HPV 16;18
12	N21112	HPV 16;52;58;51	HPV 16;52;58;51	HPV 16;52;58;51	HPV 16;52;58;51
13	N21113	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16
14	N21114	HPV 18	HPV 18	HPV 18	HPV 18
15	N21115	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16
16	N21116	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16
17	N21117	HPV 18	HPV 18	HPV 18	HPV 18
18	N21118	HPV 16;39	HPV 16;39	HPV 16;39	HPV 16;39
19	N21119	HPV 18	HPV 18	HPV 18	HPV 18
20	N21120	HPV 18	HPV 18	HPV 18	HPV 18
21	N21121	HPV 16;56	HPV 16;56	HPV 16;56	HPV 16;56
22	N21122	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16
23	N21123	HPV 16;18;58;59	HPV 16;18;58;59	HPV 16;18;58;59	HPV 16;18;58;59
24	N21124	HPV 16;52	HPV 16;52	HPV 16;52	HPV 16;52
25	N21125	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16

ST T	Tên mẫu	Định týp tại T0		Định týp tại T12	
		Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2
26	N21126	HPV 18	HPV 18	HPV 18	HPV 18
27	N21127	HPV 18	HPV 18	HPV 18	HPV 18
28	N21128	HPV 31;52	HPV 31;52	HPV 31;52	HPV 31;52
29	N21129	HPV 35;59	HPV 35;59	HPV 35;59	HPV 35;59
30	N21131	HPV 52	HPV 52	HPV 52	HPV 52
31	N21132	HPV 52	HPV 52	HPV 52	HPV 52
32	N21133	HPV 31	HPV 31	HPV 31	HPV 31
33	N21134	HPV 52;68	HPV 52;68	HPV 52;68	HPV 52;68
34	N21135	HPV 58;81	HPV 58;81	HPV 58	HPV 58
35	N21136	HPV 52;58	HPV 52;58	HPV 52;58	HPV 52;58
36	N21138	HPV 51;52	HPV 51;52	HPV 51;52	HPV 51;52
37	N21139	HPV 51	HPV 51	HPV 51	HPV 51
38	N21140	HPV 45	HPV 45	HPV 45	HPV 45
39	N21141	HPV 58	HPV 58	HPV 58	HPV 58
40	N21142	HPV 56	HPV 56	HPV 56	HPV 56
41	N21143	HPV 39	HPV 39	HPV 39	HPV 39
42	N21145	HPV 58,68	HPV 58,68	HPV 58,68	HPV 58,68
43	N21146	HPV 68	HPV 68	HPV 68	HPV 68
44	N21147	HPV 31	HPV 31	HPV 31	HPV 31
45	N21148	HPV 52;58;68	HPV 52;58;68	HPV 52;58;68	HPV 52;58;68
46	N21149	HPV 51;59	HPV 51;59	HPV 51;59	HPV 51;59
47	N21150	HPV 52	HPV 52	HPV 52	HPV 52
48	N21151	HPV 31	HPV 31	HPV 31	HPV 31
49	N21152	HPV 66	HPV 66	HPV 66	HPV 66
50	N21153	HPV 39	HPV 39	HPV 39	HPV 39
51	N21154	HPV 52	HPV 52	HPV 52	HPV 52
52	N21155	HPV 66	HPV 66	HPV 66	HPV 66
53	N21156	HPV 52	HPV 52	HPV 52	HPV 52
54	N21157	HPV 31;51;52	HPV 31;51;52	HPV 31;51;52	HPV 31;51;52
55	N21158	HPV 56	HPV 56	HPV 56	HPV 56

ST T	Tên mẫu	Định týp tại T0		Định týp tại T12	
		Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2
56	N21159	HPV 58	HPV 58	HPV 58	HPV 58
57	N21160	HPV 31;45;52	HPV 31;45;52	HPV 31;45;52	HPV 31;45;52
58	N21194	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16
59	N21200	HPV 31, 59	HPV 31, 59	HPV 31, 59	HPV 31, 59
60	N21207	HPV 33;51;52	HPV 33;51;52	HPV 33;51;52	HPV 33;51;52

(*): Týp HPV nguy cơ cao

Phụ lục 2. 5 Kết quả kiểm tra độ ổn định của Panel mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu lâm sàng tại thời điểm 0 tháng (T0) và 12 tháng (T12)

TT	Tên mẫu	Định typ và giá trị Ct tại thời điểm T0					Định typ và giá trị Ct tại thời điểm T12					SD
		Lần 1		Lần 2		IC TB	Lần 1		Lần 2		IC TB [#]	
		14 typ HPV	IC	14 typ HPV	IC		14 typ HPV	IC	14 typ HPV	IC		
1	N21001	Âm tính*	18,79**	Âm tính	18,51	18,51	Âm tính	18,39	Âm tính	18,97	18,68	0,12
2	N21004	Âm tính	19,28	Âm tính	19,27	19,28	Âm tính	19,23	Âm tính	19,50	19,37	0,06
3	N21010	Âm tính	19,70	Âm tính	19,45	19,58	Âm tính	19,55	Âm tính	19,76	19,66	0,06
4	N21015	Âm tính	19,65	Âm tính	19,52	19,59	Âm tính	19,68	Âm tính	19,59	19,64	0,04
5	N21019	Âm tính	23,20	Âm tính	22,82	23,01	Âm tính	23,80	Âm tính	23,20	23,50	0,35
6	N21021	Âm tính	27,22	Âm tính	26,46	26,84	Âm tính	27,35	Âm tính	27,19	27,27	0,30
7	N21022	Âm tính	23,98	Âm tính	23,34	23,66	Âm tính	24,35	Âm tính	23,74	24,05	0,27
8	N21030	Âm tính	19,70	Âm tính	19,12	19,41	Âm tính	19,69	Âm tính	19,62	19,66	0,17
9	N21034	Âm tính	24,83	Âm tính	24,59	24,71	Âm tính	25,04	Âm tính	24,98	25,01	0,21
10	N21038	Âm tính	19,69	Âm tính	18,61	19,15	Âm tính	19,29	Âm tính	19,76	19,53	0,27
11	N21041	Âm tính	19,89	Âm tính	19,74	19,82	Âm tính	19,78	Âm tính	19,91	19,85	0,02
12	N21047	Âm tính	20,67	Âm tính	19,78	20,23	Âm tính	20,04	Âm tính	20,49	20,27	0,03
13	N21056	Âm tính	21,08	Âm tính	20,95	21,02	Âm tính	21,21	Âm tính	21,45	21,33	0,22
14	N21058	Âm tính	24,40	Âm tính	24,02	24,21	Âm tính	24,04	Âm tính	24,13	24,09	0,09

TT	Tên mẫu	Định tít và giá trị Ct tại thời điểm T0					Định tít và giá trị Ct tại thời điểm T12					SD
		Lần 1		Lần 2		IC TB	Lần 1		Lần 2		IC TB [#]	
		14 tít HPV	IC	14 tít HPV	IC		14 tít HPV	IC	14 tít HPV	IC		
15	N21071	Âm tính	19,24	Âm tính	19,01	19,13	Âm tính	18,94	Âm tính	19,05	19,00	0,09
16	N21073	Âm tính	25,26	Âm tính	25,24	25,25	Âm tính	25,28	Âm tính	25,58	25,43	0,13
17	N21087	Âm tính	28,89	Âm tính	26,83	27,86	Âm tính	27,61	Âm tính	27,79	27,70	0,11
18	N21091	Âm tính	21,40	Âm tính	21,66	21,53	Âm tính	21,74	Âm tính	21,82	21,78	0,18
19	N21098	Âm tính	19,48	Âm tính	19,52	19,50	Âm tính	19,51	Âm tính	19,97	19,74	0,17
20	N21100	Âm tính	23,31	Âm tính	23,60	23,46	Âm tính	22,96	Âm tính	23,74	23,35	0,07

(*): Âm tít với 14 tít HPV nguy cơ cao; (**): Giá trị Ct, (#) TB: trung bình

Phụ lục 2. 6 Kết quả kiểm tra độ ổn định của Panel mẫu chuẩn xác định độ chính xác tại thời điểm 0 tháng (T0) và 12 tháng (T12)

T T	Týp HPV	Số bản sao/µl	Giá trị Ct tại T0			Giá trị Ct tại T12			SD
			Lần 1	Lần 2	Ct TB	Lần 1	Lần 2	Ct TB [#]	
1	HPV16	50	24,9*	25,90	25,42	25,38	25,77	25,58	0,11
		10	27,96	28,24	28,10	27,15	28,38	27,77	0,24
		5	28,86	30,06	29,46	28,29	27,14	27,72	1,23
		Mẫu âm tính	Âm tính**	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
2	HPV18	50	25,66	24,65	25,16	24,27	26,45	25,36	0,14
		10	26,15	27,26	26,71	25,63	25,20	25,42	0,91
		5	27,40	27,76	27,58	27,16	26,28	26,72	0,61
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
3	HPV31	1000	19,52	19,42	19,47	20,28	21,17	20,73	0,89
		100	21,48	22,78	22,13	23,92	24,94	24,43	1,63
		50	22,79	23,86	23,33	25,25	26,08	25,67	1,65
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
4	HPV33	1000	19,43	20,93	20,18	19,74	20,10	19,92	0,18
		100	24,60	24,91	24,76	24,31	24,74	24,53	0,16
		50	27,91	27,13	27,52	27,92	27,26	27,59	0,05
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
5	HPV35	1000	21,07	22,87	21,97	22,47	22,83	22,65	0,48
		100	25,23	26,83	26,03	25,82	27,69	26,76	0,51
		50	27,62	27,93	27,78	27,10	29,59	28,35	0,40
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
6	HPV39	1000	20,25	21,14	20,70	22,78	22,71	22,75	1,45
		100	23,83	24,62	24,23	25,23	26,91	26,07	1,30
		50	25,81	26,03	25,92	26,42	28,07	27,25	0,94
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
7	HPV45	1000	21,98	22,42	22,20	23,53	23,98	23,76	1,10
		100	25,68	26,36	26,02	27,21	28,40	27,81	1,26
		50	27,22	27,94	27,58	28,24	29,66	28,95	0,97
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		

T T	Typ HPV	Số bản sao/μl	Giá trị Ct tại T0			Giá trị Ct tại T12			SD
			Lần 1	Lần 2	Ct TB	Lần 1	Lần 2	Ct TB [#]	
8	HPV51	1000	20,84	20,18	20,51	21,09	20,23	20,66	0,11
		100	24,14	24,35	24,25	24,67	23,93	24,30	0,04
		50	25,27	25,42	25,35	25,59	25,04	25,32	0,02
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
9	HPV52	1000	21,01	21,30	21,16	21,77	19,90	20,84	0,23
		100	25,02	25,48	25,25	23,17	24,36	23,77	1,05
		50	26,79	26,41	26,60	25,52	26,10	25,81	0,56
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
10	HPV56	1000	18,80	19,76	19,28	20,34	20,97	20,66	0,97
		100	24,19	24,37	24,28	24,30	26,47	25,39	0,78
		50	26,35	28,21	27,28	26,20	26,41	26,31	0,69
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
11	HPV58	1000	21,06	21,60	21,33	21,68	21,20	21,44	0,08
		100	24,19	24,98	24,59	24,15	24,72	24,44	0,11
		50	27,22	27,27	27,25	28,01	28,50	28,26	0,71
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
12	HPV59	1000	19,44	19,41	19,43	20,62	21,27	20,95	1,07
		100	22,98	22,88	22,93	23,29	24,69	23,99	0,75
		50	23,87	24,43	24,15	24,65	26,52	25,59	1,01
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
13	HPV66	1000	22,02	22,30	22,16	22,14	21,86	22,00	0,11
		100	25,62	26,04	25,83	25,77	25,54	25,66	0,12
		50	26,92	26,73	26,83	26,58	26,25	26,42	0,29
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		
14	HPV68	1000	21,50	20,33	20,92	20,63	21,06	20,85	0,05
		100	25,13	25,69	25,41	25,47	23,84	24,66	0,53
		50	24,77	24,98	24,88	26,70	24,74	25,72	0,60
		Mẫu âm tính	Âm tính	Âm tính		Âm tính	Âm tính		

(*) : Giá trị Ct; (**) Âm tính với 14 typ HPV nguy cơ cao, (#) TB: trung bình

PHỤ LỤC 3

Phụ lục 3.1: Đồng ý cho phép nghiên cứu sinh sử dụng kết quả của đề tài làm luận án

Phụ lục 3.2: Mẫu phiếu điều tra của các nhóm đối tượng

Phụ lục 3.3: Giấy chứng nhận chất lượng của NIHE – Realtime PCR hrHPV Kit