

BƯỚC ĐẦU CHẨN ĐOÁN HPV BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ TẠI BỆNH VIỆN PHONG - DA LIỄU TRUNG ƯƠNG QUY HÒA

Nguyễn Phúc Như Hà

HPV và vai trò gây bệnh ở người

Theo điều tra của Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế, tỉ lệ nhiễm HPV của phụ nữ toàn cầu dao động trong khoảng 9-13%, nghĩa là cứ 10 phụ nữ có 1 người nhiễm HPV. Ở Việt nam nếu chỉ tính riêng ung thư cổ tử cung thì số người chết vì HPV đã cao hơn nhiều so với HIV. Trong 10 năm qua có khoảng 6.000 phụ nữ chết vì ung thư cổ tử cung cao gấp đôi so với phụ nữ chết vì HIV/AIDS; mặc dù khác với HIV, các tổn thương do HPV, thậm chí ung thư do HPV có thể chữa khỏi hoàn toàn nếu được phát hiện sớm. Tuy nhiên thực tế ở Việt nam, phần lớn bệnh nhân ung thư cổ tử cung chỉ được phát hiện ở giai đoạn cuối, vài năm trước khi qua đời.

Human Papilloma virus (HPV) thuộc họ Papillomaviridae. HPV được lây truyền qua da và phổ biến nhất là qua đường tình dục và tất nhiên những nơi có tiếp xúc trực tiếp hay gián tiếp như âm đạo, cổ tử cung, hậu môn, đường niệu, bàng quang, miệng, mắt... sờ mó, hôn, đồng tính luyến ái, gây lây nhiễm qua niêm mạc miệng và từ đó xâm nhập vào cơ thể. Người bị nhiễm HPV có thể biểu hiện lâm sàng là các thương tổn tại chỗ với trạng thái tăng sinh nội mô biểu bì thuộc nhiều dạng khác nhau như sùi niêm mạc, viêm, xơ cứng biểu mô, khối u papilloma vùng sinh dục, vùng hậu huyệt, dạng tăng sinh tế bào keratin. Hầu như mọi type HPV đều có biểu hiện đặc trưng liên quan đến papilloma vùng sinh dục như condyloma, u xơ và u mềm cổ tử cung....

HPV là một trong những tác nhân lây nhiễm qua đường tình dục phổ biến. Biểu hiện lâm sàng là hình ảnh u sùi điển hình vùng hậu môn-sinh dục như âm hộ, âm đạo, trực tràng, vùng hậu môn, dương vật và u sùi vùng hậu huyệt đặc biệt là ung thư cổ tử cung (CTC). Hiện nay nguyên nhân gây nên ung thư CTC đã được biết một cách rõ ràng là do HPV gây ra. HPV được chia làm hai nhóm, nhóm nguy cơ cao và nguy cơ thấp (về tính gây ung thư). Nhóm nguy cơ cao có liên quan trực tiếp đến bệnh lý ung thư chúng được phát hiện có mặt trên 90% các trường hợp ung thư CTC (ung thư tế bào lát hay ung thư tế bào tuyến), trái lại nhóm nguy cơ thấp thì hiếm gặp trong các trường hợp ung thư. Tần suất lưu hành HPV cao trong cộng đồng, 6-11% ở người bình thường (có tài liệu báo cáo là >20%).

Có nhiều hơn 100 type HPV có vai trò gây bệnh liên quan đến bệnh lý da và niêm mạc và khoảng 40 type có tác động lên đường sinh dục, đặc biệt liên quan đến bệnh lý ung thư CTC. Nhóm được gọi là nguy cơ cao bao gồm các type 16 (HPV-16), 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 66 và HPV-68. Các type HPV-6,11, 42, 43, 44 được gọi là nhóm nguy cơ thấp.

Cơ chế gây bệnh của HPV:

- Có 2 loại protein điều chỉnh sự phân chia và mức độ phát triển tế bào là RB (retinoblast) và p53 (protein 53 điều hòa khối u) Khi 2 gen E6 và E7 của HPV tổng hợp protein, các protein này tự tiếp xúc với RB và p53 sẽ gây cản trở quá trình điều chỉnh sự phân chia tế bào, kết quả là tế bào bị nhiễm HPV sinh sản tự phát, không có sự kiểm soát, thay đổi cấu trúc gen, gen không thể sửa chữa được và phát triển thành tế bào ung thư.
- HPV tác động chủ yếu vào biểu mô lát tầng không sừng hóa của cổ tử cung tại nơi tiếp giáp giữa cổ trong và cổ ngoài (nơi tiếp giáp 2 loại biểu mô khác nhau: biểu mô tế bào trụ tuyến và biểu mô lát tầng không sừng hóa). Biểu mô lát tầng không sừng hóa có khả năng bảo vệ và được phát triển lên hướng bề mặt, sau đó sẽ bong ra. Khi nhiễm virus những tổn thương ban đầu có thể xảy ra ở biểu mô lát vốn không tiếp xúc với mạch máu, do đó không gây ra hiện tượng viêm, không hoạt hóa miễn dịch và hầu như miễn nhiễm sau khi đã nhiễm tự nhiên HPV. Khi virus tấn công được vào vào lớp tế bào đáy, lớp tế bào này vốn có khả năng sinh sản cao và gây nên hiện tượng phát triển mạnh hơn bình thường của một rồi đến nhiều lớp tế bào sau đó. Khi các tế bào phát triển bất thường này chiếm toàn bộ các lớp tế bào của biểu mô lát gây hiện tượng dị sản hay ung thư tại chỗ. Sau đó có khả năng lan sâu xuống màng đáy và hình thành ung thư CTC giai đoạn xâm lấn.

Biểu hiện lâm sàng nhiễm HPV:

- Xuất hiện U sùi mào gà quanh vùng hậu môn, sinh dục cả nam và nữ, thường do HPV-6, 11 gây nên, không dẫn đến ung thư. Bệnh có thể tự khỏi hoặc tồn tại và tăng số lượng và kích thước u sùi. Khi những u sùi này chuyển sang màu nâu đậm hoặc đỏ gạch, lúc này tế bào đã bắt đầu chuyển dạng (đặc biệt đối với HPV-16, 18)
- HPV có thể xâm nhập một cách “lặng lẽ”, người bị nhiễm không có triệu chứng lâm sàng, phần lớn tế bào ở vùng bị nhiễm bình thường. Phương pháp sinh học phân tử phát hiện khoảng 10% số phụ nữ CTC bình thường có sự hiện diện của DNA HPV. HPV gây nhiễm dạng này chủ yếu thuộc nhóm nguy cơ thấp như HPV-6/11 và một số type khác.
- HPV xâm nhiễm vào cơ thể và có biểu hiện lâm sàng, chủ yếu do các type thuộc nhóm “nguy cơ cao”, gây biến đổi tế bào về mặt hình thái và cấu trúc. Những tế bào mắc cảm với virus chủ yếu ở vùng sinh dục, đặc biệt là CTC. Tuy nhiên không phải nhiễm HPV là có ung thư CTC, nhiễm HPV thuộc bất cứ type nào cũng có khả năng tự khỏi và không để lại di chứng. Tổn thương dị sản hay ung thư CTC cần có một thời gian khá dài phát triển tại biểu mô, dị sản hay ung thư tại chỗ... thời gian trung bình 10-20 năm, đây chính là điểm thuận lợi để tầm soát ung thư CTC.

Chẩn đoán tế bào học nhiễm HPV:

- Năm 1949 George Papanicolaou đã đưa ra một phương pháp tế bào học phát hiện những bất thường của tế bào biểu mô CTC để phát hiện sớm ung thư CTC, được gọi là PAP's smear. Nguyên lý dựa trên tính chất bong ra một cách tự nhiên, liên tục của tế bào âm đạo, CTC, đặc biệt là các tế bào bất thường thì tính bong sớm và rất dễ bong.
- Phân tích hình thái học chi tiết người ta cho rằng dấu hiệu của tế bào bị nhiễm HPV là sẽ bị biến đổi thành các dạng tế bào đa nhân, tế bào đa nhân khổng lồ, hoặc nhân teo lại, hay có thể tìm thấy tế bào bóng, tế bào có vòng sáng quanh nhân....
- Phương pháp PAP's smear có độ nhạy 44-78% và độ đặc hiệu cao 91-96%. Tuy nhiên phương pháp này cũng có tỉ lệ âm tính giả, theo các tác giả giao động từ 1,1 -29,7%.
- Ngày nay nhờ sự phát triển của sinh học phân tử, đặc biệt là kỹ thuật PCR cho phép nhận biết chính xác có nhiễm HPV hay không và nhiễm type nào để tìm thấy nguy cơ cao hay thấp có khả năng dẫn đến ung thư CTC.

PAP's smear và HPV – PCR:

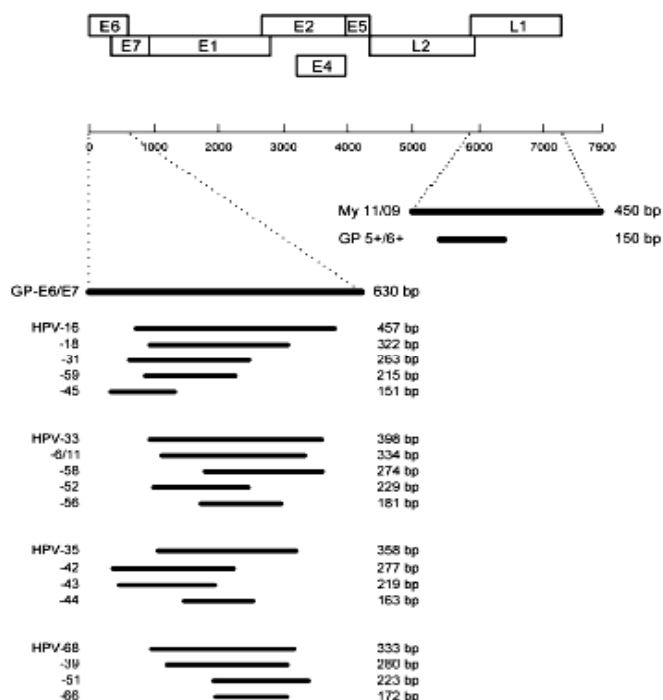
Xét nghiệm HPV-PCR có giá trị khác đối với xét nghiệm PAP's smear. Với PAP's smear ta có thể nói có hay không tổn thương nghi ngờ ác tính hay không ác tính trên CTC. Trong khi đó xét nghiệm HPV-PCR sẽ nói hiện tại có nhiễm HPV hay không, nếu có là nhóm nào – nguy cơ cao hay nguy cơ thấp. HPV-PCR dương tính không có nghĩa là ung thư CTC, việc nhận định có nhiễm HPV hay không có nhiễm HPV không nói được tình trạng mô học hay tế bào học của CTC mà chỉ có thể nói rằng người được thử đang trong tình trạng nhiễm HPV. Xét nghiệm HPV-PCR ngày nay được khuyến cáo sử dụng kèm với xét nghiệm PAP's smear nhằm nâng cao khả năng sàng lọc các trường hợp nghi ngờ, giúp theo dõi bệnh chặt chẽ hơn và có hiệu quả thật sự trong tầm soát ung thư CTC.

Chẩn đoán HPV bằng phương pháp Sinh học phân tử tại bệnh viện Phong Da liễu Trung ương Quy hoà

Ứng dụng từ nhiều nghiên cứu đã được công bố trên thế giới kỹ thuật PCR đã được triển khai thực hiện và áp dụng tại Bệnh viện Phong Da liễu TW Quy hoà để phát hiện và định type HPV .

- PCR đặc hiệu theo nhóm (gs-PCR Group-specific PCR) phát hiện nhiều type HPV cùng một nhóm. Sử dụng cặp mồi chung (consensus primers) là MY09 và MY11 có trình tự: (5'-GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT- 3') và (5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'), có khả năng khuếch đại đoạn DNA đích có độ dài 450 cặp nucleotid, nằm trên gen L1, L1 là gen cấu trúc nằm trên vỏ capsid của HPV. Để tăng tuyệt đối độ nhạy của phản ứng PCR cặp mồi thứ hai cũng được sử dụng cho kỹ thuật PCR “làm tổ” (nested PCR) là cặp mồi GP5+ và GP6+ có trình tự: (5'- TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3') và (5' – GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT-3'), cặp mồi này khuếch đại một đoạn DNA nằm trong

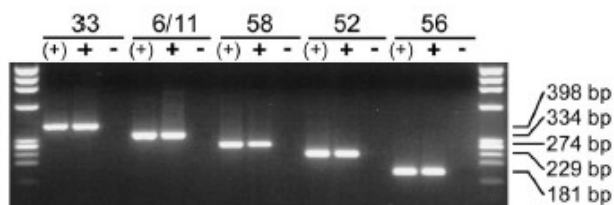
trong đoạn DNA sản phẩm của PCR lần I từ cặp mỗi MY9 và MY11, có độ dài 150 cặp nucleotid.



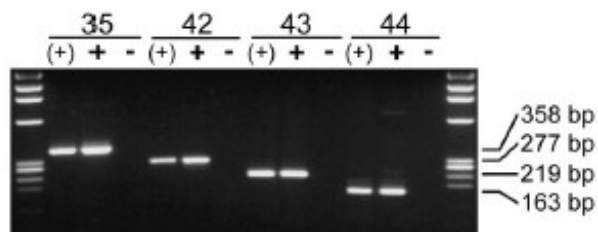
Hình 1: Vị trí các gen L1 và E6/E7 của HPV và độ dài sản phẩm PCR trong phát hiện và định type HPV.

- PCR đặc hiệu cho từng type HPV (ts-PCR: type specific PCR), việc định type HPV dựa vào sự khác nhau về trình tự các nucleotid trên gen E6/E7, gen E6/E7 là gen gây ung thư (oncogenes) có khả năng tổng hợp protein gây ung thư, do đó nó có khả năng quyết định tính gây bệnh của virus và chúng có mức độ biến đổi khác nhau.

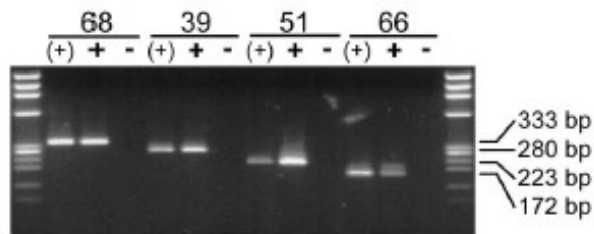
Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho từng type bao gồm các type được gọi là nguy cơ cao là: HPV type 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 và 68. Các type được gọi là nguy cơ thấp là: HPV type 6-11, 42, 43 và 44.



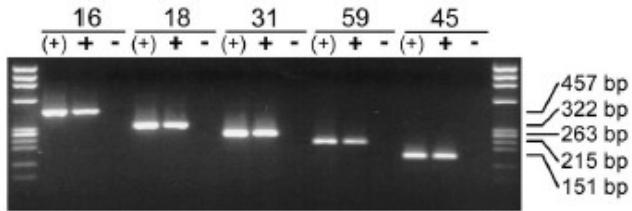
Hình 2: Kết quả ts-PCR định type HPV type 33, 6/11, 58, 52 và 56



Hình 3: Kết quả ts-PCR định type HPV type 35, 42, 43 và 44

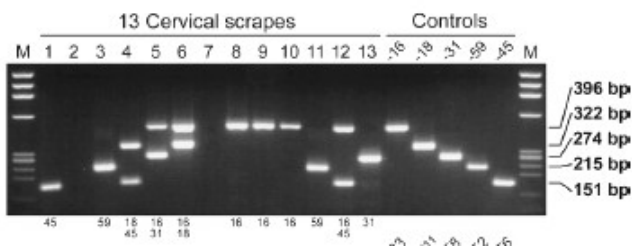


Hình 4: Kết quả ts-PCR định type HPV type 68, 39, 51 và 66



Hình 5: Kết quả ts-PCR định type HPV type 16, 18, 31, 59 và 45

- Kỹ thuật Nested-Multiplex PCR (NMPCR) cũng được ứng dụng, hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm đồng thời 3-4 cặp mỗi sao cho sản phẩm PCR có độ dài khác biệt để có thể phân biệt được trên thạch điện di. Kỹ thuật đòi hỏi nghiêm ngặt các điều kiện về nhiệt độ, nồng độ các thành phần của hỗn hợp PCR và việc chọn lựa các cặp mỗi... để phản ứng khuếch đại đặc hiệu có thể xảy ra.



Hình 6: Phát hiện và định type HPV bng kỹ thuật NMPCR

Một thống kê tại khoa xét nghiệm Bệnh viện Phong Da liễu Trung ương Quy hoà:

- Có 17/21 mẫu (80%) bệnh phẩm dịch cổ tử cung của bệnh nhân được chẩn đoán “tổn thương tế bào gai mức độ thấp LSIL/HPV” được gửi từ Trung tâm chăm sóc sức khoẻ sinh sản tỉnh Bình định cho kết quả dương tính với PCR-HPV.
- 34/35 (97%) mẫu bệnh phẩm là u sùi sinh dục của bệnh nhân được chẩn đoán sùi mào gà cho kết quả dương tính với PCR-HPV và 100% thuộc type HPV-6/11.
- Lấy ngẫu nhiên 30 mẫu bệnh phẩm là phết cổ tử cung của bệnh nhân STD được chỉ định làm PCR-Chamydia trachomatis, có 8/30 (26%) mẫu cho kết quả dương tính với PCR-HPV.

Kết quả này phù hợp với nhiều thống kê khác, cho thấy tình hình dịch tễ của HPV không chỉ đối với ung thư cổ tử cung mà còn là vấn đề cần thiết phải quan tâm trong các bệnh lây truyền qua đường tình dục.

Tài liệu tham khảo:

1. Lê Thanh Hoà (2006) Y-sinh học phân tử, Nhà xuất bản y học.
2. http://www.medinet.hochiminhcity.gov.vn/ttyh/bshkhkt/HPV_UngThuCTC.htm
3. K.Sotlar, D.Diemer, A.Dethleffs (2004) Detection and typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR.. Journal of Clinical Microbiology, P.3176-3184.