Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Study of Abundance and Genotyping of Human Papillomavirus in Samples of Patients Suspected to Cervical Cancer Referred to Masoud Labratory in Tehran

Mohammad Mostafapour Bandpey[1], Saeed Zaker Bostanabad[1*], Mohammad-Karim Rahimi[2]

1. Department of Biology, Biology Science Faculty, Islamic Azad University, Parand branch, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, Medical Faculty, Islamic Azad University, Tehran Medical branch, Tehran, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 13:50 +0330 on Sunday March 10th 2019

Article Information

Article history:
Received: 2018/07/12
Accepted: 2018/11/04
Available online: 2018/12/22

Article Subject:
Medical Virology

IJMM 2018; 12(5): 348-356

Corresponding author:

Saeed Zaker Bostanabad
Department of Biology, Biology Science Faculty, Islamic Azad University, Parand branch, Tehran, Iran

Email:
saeedzaker20@yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Cervical cancer is the second most common cancer in women worldwide. The presence of HPV has been implicated in more than 99% of cervical cancer worldwide. Human papillomavirus is a heterogeneous virus, categorized to two groups of high-risk and low-risk genotyped according to the level of infection that leads to cervical cancer. HPV screening is recommended for the further evaluation of abnormal pap test or during follow-up after treating precancerous lesions. Genotyping of different high-risk HPV (hrHPV) types obtained from smear tests has not yet gained widespread acceptance in clinical practice. Genotyping of hrHPV could be helpful for the risk stratification of HPV-positive.

Materials and Methods: In this study 143 women residual samples were available for HPV assays in Masoud laboratory in Tehran. After extracting DNA by kit, for genotyping detection of human papillomavirus PCR amplification, Reverse dot blot hybridization methods was used.

Results: Among these samples, 34.2% were HPV positive. In this research, the most common genotype was HPV-18 from high risk HPV genotype and HPV-6 was the most common from low risk genotype of HPV. The most Age category that has been detected positive HPV from category 26-35 years.

Conclusions: The variety of HPV genotype detection in cervical cancer screening increases the importance of epidemiological study controversially in world. Therefore for characterizing genotype of HPV, Reverse dot blot hybridization can be of great help in this regard.

Keywords: Genotype, Cervical cancer, Human Papillomavirus, Hybridization

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Mostafapour Badpey M, Zaker Bostanabad S, Rahimi M K. Study of Abundance and Genotyping of Human Papillomavirus in Samples of Patients Suspected to Cervical Cancer Referred to Masoud Labratory in Tehran . Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (5) :348-356

www.SID.ir

Archive of SID

مقالهٔ پژوهشی

مجلهٔ میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ ـ شمارهٔ ۵ ـ آذر ـ دی ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی فراوانی و ژنوتایپینگ ویروس پاپیلومای انسانی در نمونه‌های بیماران مشکوک به سرطان دهانهٔ رحم مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مسعود در شهر تهران

محمد مصطفی پوربندپی[۱]، سعید ذاکر بستان‌آباد*[۱]، محمدکریم رحیمی[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران

۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۲۱

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۱۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۰/۰۱

موضوع:

ویروس‌شناسی پزشکی

IJMM1397;12(5): 348-356

نویسندهٔ مسئول:

سعید ذاکر بستان‌آباد

گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران

پست الکترونیک:

saeedzaker20@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سرطان دهانهٔ رحم، دومین بدخیمی شایع در زنان سراسر جهان است. حضور ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) در بیش از ۹۹درصد مبتلایان به سرطان دهانهٔ رحم به چشم می‌خورد. HPV ویروسی ناهمگون است که براساس میزان عفونت و ایجاد سرطان دهانهٔ رحم به دو گروه کم‌خطر (Low risk) و پرخطر (High risk) طبقه‌بندی می‌شود. غربالگری HPV برای ارزیابی بیشتر پاپ اسمیرهای غیرطبیعی و موارد تحت‌درمان پیش‌سرطانی توصیه می‌شود. تعیین ژنوتیپ متفاوت تیپ‌های پرخطر به‌دست آمده از تست‌های پاپ اسمیر هنوز موردپذیرش گسترده در فعالیت بالینی قرار نگرفته است. تعیین ژنوتیپ انواع پرخطر HPV می‌تواند برای طبقه‌بندی میزان خطر در زنان با HPV مثبت مفید باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه ۱۴۳ نفر از بیماران زن مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مسعود تهران بررسی شدند. پس از استخراج DNA از طریق کیت، برای تعیین ژنوتایپ ویروس پاپیلومای انسانی از روش‌های PCR amplification و reverse dot blot hybridization استفاده شده است.

یافته‌ها: از بین نمونه‌های اخذشده ۳۴/۲درصد HPV مثبت بودند. HPV-18 شایع‌ترین ژنوتایپ پرخطر و HPV- 6 شایع‌ترین ژنوتایپ کم‌خطر در این مطالعه بودند و گروه سنی ۳۵-۲۶ سال بیشترین درصد موارد HPV مثبت را به خود اختصاص دادند.

نتیجه‌گیری: تنوع ژنوتایپ‌ها در مناطق مختلف دنیا، اهمیت بررسی اپیدمیولوژی منطقه‌ای HPV را افزایش می‌دهد. لذا برای تعیین ژنوتایپ HPV استفاده از روش مولکولی Reverse dot blot hybridization می‌تواند کمک شایانی به این مسئله کند.

کلمات کلیدی: ژنوتیپ، سرطان دهانهٔ رحم، پاپیلومای ویروس انسانی، هیبریداسیون

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفادهٔ علمی از این مقاله برای مجلهٔ میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

سرطان دهانهٔ رحم دومین بدخیمی شایع و از عوامل مهم مرگ‌ومیر در زنان سراسر جهان است (۱). گزارش‌های متعدد ارتباط بین گروهی از DNA ویروس‌های انکوژنی را با توسعهٔ بدخیمی‌ها در جمعیت انسانی نشان می‌دهد که از جملهٔ آنها پاپیلومای ویروس‌های انسانی (HPV) است (۵-۲). بیش از ۱۰۰ تیپ مختلف از پاپیلومای ویروس‌های انسانی یافت شده است که حدود ۴۰ نوع آن توانایی آلوده‌کردن مجاری تناسلی را دارند (۶). ویروس پاپیلومای انسانی براساس میزان بدخیمی و ایجاد سرطان به دو گروه کم‌خطر (Low risk) و پرخطر (High risk) طبقه‌بندی شده‌اند. در آخرین طبقه‌بندی منتشرشده از سوی سازمان بهداشت جهانی آژانس بین‌المللی سازمان تحقیقات سرطان (IARC) ژنوتیپ‌های نوع ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۵، ۳۹،۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸ و ۵۹ به‌عنوان انواع پرخطر، ارقام دیگر شامل ژنوتیپ‌های ۲۶، ۳۰، ۳۴، ۵۳، ۶۶، ۶۷، ۶۸، ۶۹، ۷۰، ۷۳، ۸۲، ۸۵، ۹۷ به‌عنوان انواع احتمالا سرطان‌زا و ژنوتیپ‌های ۶ و ۱۱ که با ایجاد ضایعات خوش‌خیم دستگاه تناسلی (زگیل تناسلی) شناخته شده‌اند نیز به‌عنوان انواع کم‌خطر معرفی شده است (۷). پیشرفت سرطان، مستلزم بیان ژن‌های ویروسی، ورود DNA ویروسی به درون کروموزوم‌های میزبان و ایجاد تغییر در ژن‌ها و محصولات ژنی سلول میزبان است (۸). این گروه از ویروس‌ها برای همانندسازی ژنوم، به DNA

www.SID.ir

Downloaded from ijmm.ir at 13:50 +0330 on Sunday March 10th 2019

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:50 +0330 on Sunday March 10th 2019

پلی‌مراز سلول‌های میزبان نیاز دارند (۹) و از نقاط ورودی ایجادشده از طریق خراش‌های ظریف در لایه‌های سلول پوشاننده برای رسیدن به لایهٔ پایه اپیتلیوم یعنی مکان استقرار سلول‌های بنیادی و سلول‌های پیش‌ساز که قابلیت تکثیر دارند استفاده می‌کنند (۶،۸). انکوپروتئین‌های E6 و E7 در ویروس HPV بازیگران اصلی در سرطان‌زایی هستند و پروتئین‌های سرکوب‌کنندهٔ تومور را در سلول‌های میزبان هدف قرار می‌دهند (۸). در انواع HPV پرخطر پروتئین E6 با یک یوبی کوئیتین لیگاز، کمپلکس تشکیل می‌دهد. این کمپلکس به p53 متصل شده و در پی آن تجزیهٔ p53 آغاز شده و موجب غیرفعال‌شدن آن می‌شود (۱۰،۱۱). p53 به‌عنوان یک فاکتور رونویسی عمل کرده و بیان ژن‌های دخیل در توقف چرخهٔ سلولی و آپوپتوزیس را القا می‌کند (۱۲). در صورت فعالیت‌نکردن E6، پروتئین p53 افزایش یافته و باعث القای آپوپتوزیس وابسته به p53 می‌شود و قبل از تکثیر ویروس به ازبین‌رفتن سلول آلوده منجر می‌شود (۱۳). پروتئین E7 نیز با غیرفعال‌کردن پروتئین رتینوبلاستوما (Rb) و دو پروتئین مرتبط به پروتئین رتینوبلاستوما یعنی p106 و p130 تأثیر انکوژنی خود را می‌گذارد (۱۴). پروتئین رتینوبلاستوما سرکوب‌کنندهٔ تومور است و نقش اصلی را در تنظیم چرخهٔ سلولی یوکاریوتی ایفا می‌کند (۱۵). در شرایط عفونت به ویروس HPV پرخطر، پروتئین E7 با گسستن کمپلکس Rb-E2F موجب رهاشدن E2F شده و درنتیجه سلول را خارج از زمان اصلی وارد فاز S می‌کند و این امر باعث اختلال در نظم چرخهٔ سلولی می‌شود (۱۶،۱۷). ویروس پاپیلومای انسانی حین عبور از لایهٔ بازال با لایه‌های سلول‌های سطحی تکامل خود را کامل می‌کند که این امر باعث بالارفتن بروز پروتئین‌های L_1 و L_2 ویروس می‌شود که در شناسایی آنها نقش مهمی دارد. انواع HPV پرخطر، در اپیتلیوم گردن رحم ضایعاتی ایجاد می‌کند که شدت آن براساس میزان جایگزینی سلول‌های اپیتلیال سنگفرشی با سلول‌های بازالوئید به CIN I، CIN II، CIN III درجه‌بندی می‌شود (۱۸). آلودگی با انواع پرخطر HPV یک عامل ضروری و نه کافی در ایجاد سرطان گردن رحم است، لذا از سایر عوامل مرتبط با سرطان گردن رحم می‌توان به استعمال دخانیات، سن، تغذیه، نژاد، موقعیت جغرافیایی، داشتن چند شریک جنسی، مصرف طولانی‌مدت قرص‌های ضدبارداری، ضعف سیستم ایمنی و فاکتورهای مربوط به میزبان اشاره کرد (۱۹،۲۰). بنا بر گزارش‌های اعلام‌شده، شیوع جهانی عفونت‌های HPV در سال ۲۰۱۲ حدود ۴۴۰ میلیون نفر برآورد شده است. این عفونت‌ها فقط در سال ۲۰۱۲ منجر به ۵۱۰۰۰۰ مورد سرطان گردن رحم و تقریبا ۲۸۸۰۰۰ مورد مرگ شده‌اند (۲۱). همچنین با توجه به آمار منتشرشده از تشخیص پاپیلومای ویروس انسانی در انواع بیماری‌ها، عفونت این ویروس در ۹۹درصد سرطان دهانهٔ رحم، ۹۷درصد سرطان مقعد، ۷۰درصد سرطان واژن، ۴۷درصد سرطان آلت تناسلی، ۴۰درصد سرطان‌های دستگاه گوارش، ۴۷درصد سرطان اورلوژی و ۱۱درصد موارد سرطان دهان مشاهده شده است (۲۲). در اکثر نتایج اخذشده از مطالعات محققان داخل و خارج کشور، وفور ژنوتیپ‌های ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ بیشتر از ژنوتیپ‌های دیگر به چشم می‌خورد (۲۳،۲۴)، لذا بررسی فراوانی و تعیین ژنوتیپ HPV به‌دلیل مشخص‌شدن تیپ‌های کم‌خطر و پرخطر دارای ارزش تشخیصی و درمانی بوده و می‌توان با غربالگری و تشخیص به‌موقع از پیشرفت ضایعاتی که به سمت بدخیمی سوق داده می‌شوند، جلوگیری کرد (۲۵،۲۶). بر این اساس توصیه می‌شود زنانی که بین ۳۰ تا ۶۵ سال سن دارند، آزمون غربالگری را هر ۵ سال انجام دهند. در این مطالعه با هدف تعیین ژنوتیپ ویروس پاپیلومای انسانی و فراوانی آنها از روش‌های PCR amplification و Reverse dot blot hybridization استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۴۳ نفر مرتبط به ویروس پاپیلومای انسانی از میان ۱۱۸۳ نفر از افراد مراجعه‌کننده با علائم ضایعات مشکوک به آزمایشگاه مسعود تهران در فاصلهٔ زمانی زمستان ۱۳۹۵ تا ابتدای پاییز ۱۳۹۶ بررسی شده‌اند. نمونه‌برداری با کسب رضایت از بیماران، از سوی پزشک متخصص و کارشناسان آزمایشگاه از بیوپسی و یا ترشحات واژن و دهانهٔ رحم بیماران از طریق سوآپ استریل (براش) صورت گرفت.

برای جداسازی DNA پاپیلوماویروس انسانی از نمونه‌ها، طبق دستورالعمل کیت استخراج DNA از کمپانی (DNA-Technology) اقدام شد. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه برای استخراج DNA در مجاورت محلول Lysis buffer، محلول رسوب‌دهنده، محلول شست‌وشو و حل‌کننده قرار گرفت. DNA به‌دست‌آمده را می‌توان برای مدت یک ماه در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس و برای یک سال در دمای ۷۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری کرد.

در ادامه، عمل ژنوتایپینگ HPV با استفاده از کیت HPV Direct Flow Chip محصول کمپانی Master Diagnostica انجام

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:50 +0330 on Sunday March 10th 2019

شد. این روش در دو مرحله انجام گرفت: مرحلهٔ اول PCR amplification؛ مرحلهٔ دوم Reverse dot blot Hybridization.

PCR amplification

در این مرحله ۴ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده را با ۳۶ میکرولیتر معرف PCR که شامل Hot Start DNA Polymerase و Master Mix است، مخلوط کرده و عمل PCR براساس جدول شمارهٔ ۱ انجام شد.

در این مرحله DNAهای استخراج‌شده در مجاورت پرایمرهای اختصاصی قرار می‌گیرد که باعث تکثیر قطعاتی از ناحیهٔ L_1 ژنوم ویروس پاپیلوی انسانی می‌شود. پس از عمل PCR، محصولات PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه دناتوره شد.

جدول شمارهٔ ۱. برنامهٔ عملیات PCR

زمان	دما	تعداد سیکل
۱۰ دقیقه	۲۵ درجهٔ سلسیوس	1 Cycle
۳ دقیقه	۹۴ درجهٔ سلسیوس	1 Cycle
۳۰ ثانیه	۹۴ درجهٔ سلسیوس	15 Cycle
۳۰ ثانیه	۴۲ درجهٔ سلسیوس	
۳۰ ثانیه	۷۲ درجهٔ سلسیوس	
۳۰ ثانیه	۹۴ درجهٔ سلسیوس	35 Cycle
۳۰ ثانیه	۶۰ درجهٔ سلسیوس	
۳۰ ثانیه	۷۲ درجهٔ سلسیوس	
۵ دقیقه	۷۲ درجهٔ سلسیوس	1 Cycle

در این مرحله محصول PCR با استفاده از دستگاه Hybrispot و با کمک تراشه‌های مخصوص که از جنس غشای نایلونی بوده و حاوی پروب‌های ۳۶ ژنوتیپ مختلف پاپیلوما ویروس هستند، در مجاورت معرف‌های مخصوص شامل محلول هیبریداسیون، محلول بلوکه‌کننده، محلول استرپتاویدین ـ آلکالین فسفاتاز و بافرهای مخصوص قرار گرفته و با ایجاد پیوند بین تک‌رشته‌های DNA با پروب‌های مخصوص پاپیلومای ویروس انسانی باعث تشکیل رسوب به رنگ بنفش تیره در موقعیت هیبریداسیون پروب‌های مخصوص با محصول PCR می‌شوند. سپس از تراشه‌ها عکس گرفته (شکل ۲) و عکس‌ها را با کمک نرم‌افزار Hybrisoft آنالیز و بررسی می‌کنند. گفتنی است که تراشه‌های کیت در سطح خود علاوه بر ژنوتیپ‌های مختلف، نقاطی دارند که به‌عنوان کنترل کیفیت، صحیح‌بودن تفسیر نتایج را تضمین می‌کنند (شکل ۱).

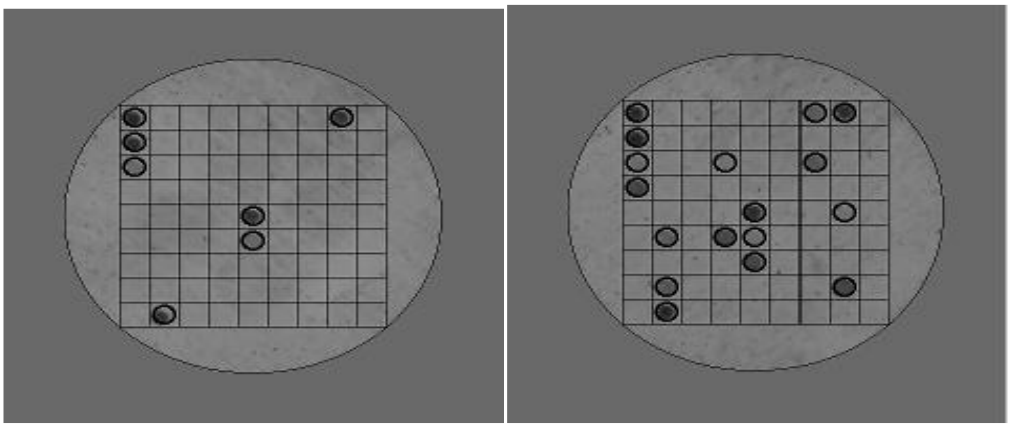
B	33	58	42	71	16	52	B	
B	35	59	43	72	18	53	6	69
C	39	66	44/55	89	26	56	11	70
U	45	68	54	84	31	58	40	71
16	51	73	61	B	33	59	44/55	72
18	52	82	62/81	C	35	66	54	89
26	53	6	67	U	39	68	61	84
31	56	11	69	42	45	73	62/81	
	B	40	70	43	51	82	67	

شکل ۱. ترتیب قرارگرفتن پروب‌های ژنوتیپ‌های مختلف HPV روی تراشهٔ کیت. نقاط «B» نشان می‌دهد که پروسهٔ هیبریداسیون به‌صورت صحیح انجام گرفته است. نقاط «C» به‌عنوان کنترل PCR هستند و نشان می‌دهند میزان DNA الگو در نمونهٔ کلینیکی به‌اندازهٔ کافی وجود دارد و تکثیر DNA به‌صورت مؤثر انجام گرفته است. نقطهٔ «U» محل قرارگرفتن پروب جهانی HPV و بقیهٔ نقاط توسط پروب ژنوتیپ‌های مختلف پوشیده شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:50 +0330 on Sunday March 10th 2019



شکل ۲. تصویر نتایج HPV مثبت با ژنوتیپ‌های ۴۴،۵۲،۵۵،۵۶،۶۲ و ۸۱ (الف) و HPV منفی (ب) روی تراشهٔ کیت Reverse dot blot hybridization. در تصویر (ب) غیر از نقاط استاندارد نقطهٔ مشخص‌شدهٔ دیگری وجود ندارد. در حالی که در تصویر (الف) علاوه بر نقاط استاندارد، نقاط هیبریداسیون ژنوتیپ‌هایی که بیمار به آنها آلوده است نیز با رنگ تیره مشخص شده است.

یافته‌ها

از بین ۱۴۳ نمونه زنان مشکوک به عفونت ویروس پاپیلومای انسانی مراجعه‌کننده به این مرکز درمانی ۴۹ نفر (۳۴/۲درصد) به این ویروس مبتلا بودند. از این مبتلایان به عفونت پاپیلومای ویروس انسانی، تعداد ۲۰ نفر (۴۱درصد) فقط ژنوتیپ‌های کم‌خطر Low Risk (۶، ۱۱، ۴۰، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۵۵، ۵۴، ۶۱، ۶۲، ۸۱ و ۸۹)، ۱۶ نفر (۳۲/۵درصد) فقط ژنوتیپ‌های پرخطر High Risk (۱۶، ۱۸، ۱، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۶، ۵۸، ۶۶، ۶۸ و ۷۳) داشتند و ۱۳ نفر (۲۶/۵درصد) مبتلا به هر دو نوع ژنوتیپ‌های کم‌خطر و پرخطر (عفونت توأم) بوده‌اند. توزیع سنی زنان مبتلا به ویروس پاپیلومای انسانی عبارت است از: تعداد ۷ نفر (۱۴/۳درصد) در محدودهٔ سنی ۲۵-۲۰ سال؛ ۱۴ نفر (۲۸/۵درصد) در محدودهٔ سنی ۳۰-۲۶ سال؛ ۱۴ نفر (۲۸/۵درصد) در محدودهٔ سنی ۳۵-۳۱ سال؛ ۷ نفر (۱۴/۳درصد) در محدودهٔ سنی ۴۰-۳۶ سال؛ ۴ نفر (۸/۲درصد) در محدودهٔ سنی ۴۵-۴۱ سال؛ ۲ نفر (۴/۱درصد) در محدودهٔ سنی ۵۰-۴۶ سال؛ ۱ نفر (۲/۱درصد) در محدودهٔ سنی بالای ۵۰ سال.

پس از بررسی ژنوتیپ‌های ۴۹ نفر از زنان مبتلا به ویروس پاپیلومای انسانی، با توجه به تعدد ژنوتیپ در برخی زنان، تعداد ۵۷ نمونهٔ کم‌خطر (low-risk) در این افراد شناسایی شد که میزان فراوانی آنها در جدول شمارهٔ ۲ به‌طور کامل شرح داده شده است.

همچنین فراوانی ژنوتیپ‌های پرخطر (high-risk) در این افراد نیز به تعداد ۳۶ مورد شناسایی شد که میزان فراوانی آنها به‌طور کامل در جدول شمارهٔ ۳ اعلام شده است.

با توجه به این موضوع که زنان مبتلا به هر دو نوع ژنوتیپ کم‌خطر و پرخطر بیشتر در معرض بدخیم‌شدن عفونت ویروس پاپیلومای انسانی قرار خواهند گرفت، فراوانی ژنوتیپ هرکدام از انواع پرخطر و کم‌خطر اهمیت بالایی دارد. تعداد زنان مبتلا به هر دو نوع ژنوتیپ کم‌خطر و پرخطر ۱۳ نفر بوده است که میزان فراوانی هرکدام از ژنوتیپ‌ها نسبت به نوع دیگر نیز بررسی شد (جدول ۴و۵).

با بررسی به‌عمل‌آمده، درصد فراوانی ژنوتیپ‌های کم‌خطر در زنان مبتلا به عفونت هم‌زمان نسبت به کل جمعیت زنان تحت مطالعه (۱۴۳ نفر) عبارت است از: HPV-42 (۲/۶۴درصد)؛ HPV-62 (۱/۷۶درصد)؛ HPV-81 (۷۶/درصد۱)؛ HPV-44 (۱/۳۲درصد)؛ HPV-55 (۱/۳۲درصد)؛ HPV-6 (۰/۸۸درصد) و مابقی ژنوتیپ‌های کم‌خطر؛ ۰/۴۴درصد.

و درصد فراوانی ژنوتیپ‌های پرخطر در زنان مبتلا به عفونت هم‌زمان نسبت به کل جمعیت زنان تحت مطالعه (۱۴۳ نفر) به شرح زیر است.

HPV-18 (۴۵/درصد۲)، HPV-39، HPV-45، HPV-52، HPV-56 و HPV-73 (۲۳/درصد۱) و HPV-31، HPV-35، HPV-53 و HPV-58 هرکدام ۰/۶ درصد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:50 +0330 on Sunday March 10th 2019

جدول ۲. درصد فراوانی ژنوتیپ‌های کم‌خطر در زنان مبتلای تحت‌مطالعه. از لحاظ درصد فراوانی بین ژنوتیپ‌های کم‌خطر، ژنوتیپ‌های ۴۲، ۶۲ و ۸۱ بعد از ژنوتیپ ۶ در رتبه‌های بعدی قرار دارند.

ژنوتیپ	HPV 6	HPV 11	HPV 40	HPV 42	HPV 43	HPV 44	HPV 54	HPV 55	HPV 62	HPV 81	HPV 89	جمع کل
تعداد	۱۰	۳	۱	۸	۱	۶	۶	۶	۷	۷	۲	۵۷
درصد	۱۷/۵	۵/۱	۱/۷۵	۱۴/۰۰	۱/۷۵	۱۰/۶	۱۰/۶	۱۰/۶	۱۲/۳	۱۲/۳	۳/۵	۱۰۰

جدول ۳. درصد فراوانی ژنوتیپ‌های پرخطر در زنان مبتلای تحت‌مطالعه. از لحاظ درصد فراوانی بین ژنوتیپ‌های پرخطر، به‌ترتیب ژنوتیپ‌های ۱۸ و ۵۶ از فراوانی بیشتری برخوردارند.

ژنوتیپ	HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 35	HPV 39	HPV 45	HPV 51	HPV 52	HPV 53	HPV 56	HPV 58	HPV 66	HPV 68	HPV 73	جمع کل
تعداد	۱	۶	۲	۲	۳	۳	۱	۳	۲	۵	۲	۲	۱	۳	۳۶
درصد	۲/۷	۱۶/۵	۵/۵	۵/۵	۸/۵	۸/۵	۲/۷	۸/۵	۵/۵	۱۳/۹	۵/۵	۵/۵	۲/۷	۸/۵	۱۰۰

جدول ۴. فراوانی ژنوتیپ‌های کم‌خطر در زنانی که به ژنوتیپ‌های پرخطر نیز مبتلا هستند. ژنوتیپ ۴۲ در زنانی که همزمان به هر دو نوع گروه ژنوتیپ‌ها آلوده هستند از فراوانی بیشتری برخوردار است.

ژنوتیپ	HPV 6	HPV 11	HPV 42	HPV 43	HPV 44	HPV 54	HPV 55	HPV 62	HPV 81	جمع کل
تعداد	۲	۱	۶	۱	۳	۱	۳	۴	۴	۲۵
درصد	۸	۴	۲۴	۴	۱۲	۴	۱۲	۱۶	۱۶	۱۰۰

جدول ۵. فراوانی ژنوتیپ‌های پرخطر در زنانی که به ژنوتیپ‌های کم‌خطر نیز مبتلا هستند. بالابودن فروانی ژنوتیپ ۱۸ در زنانی که به هر دو نوع گروه ژنوتیپ‌ها آلوده هستند، اهمیت توجه به این ژنوتیپ را بیشتر می‌کند.

ژنوتیپ	HPV 18	HPV 31	HPV 35	HPV 39	HPV 45	HPV 52	HPV 53	HPV 56	HPV 58	HPV 73	جمع کل
تعداد	۴	۱	۱	۲	۲	۲	۱	۲	۱	۲	۱۸
درصد	۲۲/۱	۵/۶	۵/۶	۱۱/۱	۱۱/۱	۱۱/۱	۵/۶	۱۱/۱	۵/۶	۱۱/۱	۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی‌ها نشان می‌دهد ارتباط معناداری بین ابتلا به عفونت پایدار انواع پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی و ایجاد سرطان گردن رحم وجود دارد (۲۷). ادغام ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی در ژنوم سلول میزبان نقطهٔ مهمی در فرایند سرطان است که به بیان پروتئین‌های ویروسی و ایجاد تغییر در سلول‌های طبیعی منجر می‌شود (۲۸). با توجه به اهمیت موضوع و با هدف تشخیص دقیق‌تر، سعی شده است از نمونه‌های ترشحات واژینال و بیوپسی استفاده شود که نسبت به نمونه‌های دیگر حساسیت بیشتری در تشخیص دارند. نمونه‌های ادرار و مایع منی حساسیت کمتری در شناسایی و تشخیص زودهنگام پاپیلومای ویروس انسانی خواهند داشت؛ به‌ویژه در مردان که بدون علائم است. همچنین امکان آلودگی در این نمونه‌ها بالا است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده ویروس پاپیلومای انسانی در ۳۴/۲درصد زنان تحت بررسی شناخته شده است. به‌طوری که در مطالعهٔ Jamshidi و همکاران (۲۰۱۷) شیوع پاپیلومای ویروس انسانی بین زنان شهر تهران ۳۸/۷۵درصد و در مطالعهٔ Chalabiani و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی شیوع پاپیلومای ویروس انسانی در جمعیت زنان نقاط مختلف کشور ۲۹/۳درصد گزارش شده است (۲۳،۲۹). در این مطالعه بیشترین گروه سنی زنان مبتلا به عفونت پاپیلوما ویروس انسانی بین ۳۵-۲۶ سال است. همچنین اکثر زنانی که همزمان به هر دو نوع ژنوتیپ کم‌خطر و پرخطر مبتلا بودند نیز در بازهٔ سنی بین ۳۵-۲۶ سال هستند. در مطالعهٔ Taghizadeh و همکاران (۲۰۱۷) نیز بیشترین گروه سنی زنان مبتلا بین ۴۰-۳۰ سال

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:50 +0330 on Sunday March 10th 2019

اعلام شده است (۳۰). در حالی که در بسیاری از کشورها به‌طور معمول بیشترین میزان شیوع این ویروس در گروه‌های سنی پایین‌تر مشاهده می‌شود که این تفاوت با عواملی مانند سن شروع فعالیت جنسی، سن ازدواج، میزان رفتار و فعالیت جنسی غیرمعمول، سطح فرهنگی، شرایط اقتصادی خانواده، مصرف دخانیات و ... توجیه‌پذیر است (۳۱). به‌عنوان مثال در گزارش Coser و همکاران (۲۰۱۵)، شیوع بالای عفونت پاپیلومای ویروس انسانی و تداوم آن در زنان کمتر از ۳۰ سال در منطقه‌ای از برزیل که از فقر مالی نیز رنج می‌برند مشاهده شده است (۳۲). همچنین در نتایج ما نیز همانند بعضی مطالعات، میزان عفونت با افزایش سن به‌تدریج کاهش یافته است (۳۳،۳۴). در این مطالعه ژنوتیپ‌های کم‌خطر (۶، ۱۱، ۴۰، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۵۵، ۵۴، ۶۱، ۶۲، ۸۱ و ۸۹) و پرخطر (۱۶، ۱۸، ۱، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۶، ۵۸، ۶۶، ۶۸ و ۷۳) شناسایی شده‌اند که در میان انواع کم‌خطر میزان HPV-6 بیشتر از بقیه بوده که این نتیجه حاکی از فراوانی این ژنوتیپ در شهر تهران است. در بسیاری از مطالعات انجام‌گرفته در نقاط مختلف ایران و جهان این نتیجه به چشم می‌خورد (۲۳،۳۵،۳۶). در بررسی یافته‌ها مشاهده می‌شود که ژنوتیپ‌های پرخطرHPV-18 و HPV-56 به‌ترتیب بیشترین درصد فراوانی را در جامعهٔ زنان تحت‌مطالعه داشتند. در کشورهای دنیا ژنوتیپ‌های پرخطر بیشتر ۱۶ و ۱۸ هستند که مورد اقتباس قرار می‌گیرند و حتی در طراحی کیت‌ها برای شناسایی ژنوتیپ‌ها و تولید واکسن بیشتر این دو تیپ اهمیت دارند. در مطالعه‌ای که بین ۷۶۵۵ زن در ایران انجام شد، شیوع پاپیلومای ویروس انسانی ۹/۴درصد و HPV-16 و HPV-18 به‌ترتیب ۲/۰۳درصد و ۱/۷درصد برآورد شد (۳۷). در مطالعات سایر پژوهشگران داخل کشور نیز به‌غیر از ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۸ ژنوتیپ‌های ۳۹، ۵۲، ۵۳، ۵۸ گزارش شده است (۲۳،۲۹،۳۰). با توجه به تنوع نمونه‌های اخذشده از بیماران و به لحاظ اپیدمیولوژی شهر تهران، نتایج این مطالعه با دیگر نتایج محققان کمی تفاوت دارد که این خود حائز اهمیت است. همچنین با توجه به نتایج مطالعات که بیشترین ژنوتیپ پرخطر را HPV-16 اعلام می‌کردند می‌توان گفت که در سال‌های اخیر میزان فراوانی HPV-18 نسبت به HPV-16 افزایش پیدا کرده که این موضوع در گزارش Abik و همکاران نیز ذکر شده است (۳۵). با بررسی ژنوتیپ‌های کم‌خطر و پرخطر بین زنانی که هم‌زمان به هر دو نوع کم‌خطر و پرخطر مبتلا هستند، فراوانی ژنوتیپ‌های HPV-18 در انواع پرخطر و HPV-42، HPV-62 و HPV-81 در انواع کم‌خطر نسبت به بقیهٔ ژنوتیپ‌ها بیشتر هستند که این نتیجه، اهمیت ژنوتیپ ۱۸ را در مطالعات آتی دوچندان خواهد کرد. در بررسی نتایج به‌دست‌آمده ۲۴نفر (۴۹درصد) از افراد به یک ژنوتیپ و ۲۵نفر (۵۱درصد) به بیش از یک ژنوتیپ مبتلا بودند. در گزارش Chalabiani و همکاران نیز به‌ترتیب ۶۴/۶ و ۳۵/۴درصد اعلام شده است. همچنین ۳۲/۵درصد زنان مطالعه‌شده به انواع کم‌خطر و ۴۱درصد به انواع پرخطر و ۲۶/۵درصد به هردو نوع تیپ مبتلا هستند که تنوع ژنوتیپ‌های به‌دست‌آمده در این افراد می‌تواند دلیل بر ابتلا و اشاعهٔ ویروس پاپیلومای انسانی از طریق فعالیت جنسی و داشتن شرکای جنسی متعدد باشد. لذا بررسی اجتماعی این موضوع می‌تواند به سلامت اجتماع و تحکیم خانواده کمک شایانی کند. این گزارش مانند مطالعات دیگر نشان می‌دهد که با تنوع ژنوتیپ‌ها در مناطق مختلف دنیا، اهمیت بررسی اپیدمیولوژی منطقه‌ای پاپیلومای ویروس انسانی افزایش می‌یابد؛ لذا باید این‌گونه پژوهش‌ها در جمعیت بزرگ‌تر و در مناطق مختلف کشور صورت پذیرد. از نقاط قوت این مطالعه می‌توان به تنوع در سن بیماران، تنوع نمونه‌ها و استفاده از روش مولکولی Reverse Dot Blot Hybridization برای تعیین ژنوتیپ ویروس اشاره کرد. در مطالعهٔ Zandi و همکاران اشاره شده است که برای تشخیص پاپیلومای ویروس انسانی فقط روش پاپ اسمیر کافی نیست و باید از روش‌های PCR و مولکولی سود برد (۳۸). بنابراین استفاده از روش‌های مولکولی البته با توجه به هزینهٔ بالای آن باعث تشخیص و اقدامات پیشگیرانهٔ دقیق‌تر برای جلوگیری از پیشروی تغییرات سلولی اولیه به‌سمت نئوپلازی سرویکس شده و می‌توان در کنترل و درمان ژنوتیپ‌های غالب، قدمی مؤثر برداشت.

سپاسگزاری

از مدیریت و کارکنان آزمایشگاه مسعود تهران، به‌ویژه کارکنان بخش مولکولی که ما را در پیشرفت این پروژه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:50 +0330 on Sunday March 10th 2019

References

1. Kianmehr Z, Soleimanjahi H, Ardestani SK, Fotouhi F, Abdoli A. Influence of Brucella abortus lipopolysaccharide as an adjuvant on th immunogenicity of HPV-16 LIVLP vaccine in mice. Med microbiol immunol. 2015; 204(2): 205-13. https://doi.org/10.1007/s00430-014-0356-z
2. Ghittoni R. Cardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from Human papillomaviruses. Virus genes. 2010; 40(1): 1-13. https://doi.org/10.1007/s11262-009-0412-8
3. Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Zur Hausen H, de Villiers E-M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology. 2010; 401(1): 70-9. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002
4. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of Human papillomaviruses. Vaccine. 2012; 30: F55-F70. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083
5. Cho H, lee H-J, Heo Y-K. Cho Y, Gwon Y-D, Kim M-G, et al. Immunogenicity of a trivalent Human papillomavirus L1 DNA-encapsidated, non-replicable baculovirus Nano vaccine. PloS one. 2014; 9(4): e95961. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095961
6. Woodman CB, Collins S1, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nature Reviews Cancer. 2007; 7(1): 11-22. https://doi.org/10.1038/nrc2050
7. Brook G BJ, Morse S, Jawetz M. Twenty-Fourth edition printed in the united State of American 2016. Medical Microbiology. 43: 15-18.
8. Pecorino L. Molecular Biology of Cancer mechanisms, target and therapeuticsy. 2nd ed. Oxford.2008; 333-334.
9. Nguye H. Ramirez-Fort M. Rady P. The biology of human papillomaviruses. Human papillomavirus. 2014; 45: 19-32. Karger Publishers.
10. Li X, Coffino P. High-risk Human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only on determines degradation. Journal Virology. 1996; 70(7): 4509-16.
11. Scheffner M, Whitaker NJ. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. Seminars in Cancer Biology. 2003; 13(1): 59-67. https://doi.org/10.1016/S1044-579X(02)00100-1
12. Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM, Howley PM. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. The EMBO Journal. 1992; 11(13): 5013-20. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05608.x
13. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell. 1985; 43(2 pt 1): 405-13. https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9
14. Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the Human papillomavirus E7 oncoprotein. Oncogene. 2001; 20(54): 7888-98. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204860
15. Dyson N. The regulation of E2F by pRB- family proteins. Genes Development. 1998; 12(15): 2245-62. https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2245
16. Huang PS, Patrick DR, Edwards G, Goodhart PJ, Huber HE, miles L, et al. protein domains govering interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and Human papillomavirus type 16 E7 protein. Molecular and Cellular Biology. 1993; 13(2): 953-60. https://doi.org/10.1128/MCB.13.2.953
17. Patrick DR, Oliff A, Heimbrook DC. Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on Human papillomavirus type 16 E7 protein. J Biol Chem. 1994; 269(9): 6842-50.
18. Bosch F, orincz A, Munoz N, Meijer C, Shah K. The causal relation between Human papillomavirus and cervical cancer. Journal of clinical pathology. 2002; 55(4): 244-65. https://doi.org/10.1136/jcp.55.4.244
19. Palmer KE, Jenson AB, Kouokam Jc, Lasnik AB, Ghim S-J. Recombinant vaccines for the prevention of Human papillomavirus infection and cervical cancer. Exp Mol Pathol. 2009; 86: 224-33. https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.01.009
20. Doorbar J. Molecular Biology of Human papilloomavirus infection and cervical cancer. Clinical science. 2006; 110(5): 525-41. https://doi.org/10.1042/CS20050369
21. Malik H, Khan FH, Ahsan H. Human papillomavirus: current status and issues of vaccination. Arch virol. 2014; 159(2): 199-205. https://doi.org/10.1007/s00705-013-1827-z
22. Tulay P, Serakincin N. The role of human papillomaviruses in cancer progression J. cancer Metasta treat. 2016; 2: 201-13. https://doi.org/10.20517/2394-4722.2015.67
23. Chalabiani S, Khodadad Nazari M, Shabani M, Razavi Davoodi N, Sarafnejad A, Amirzargar A. Retrospective analysis of prevalence of high-risk and low-risk Human Papillomavirus (HPV) genotypes in iranian women during 2013-2016. Apjcb. 2017; 2(4): 87-92.
24. Shing Chen T, Mohd Pazudin I, Daniel Roza D, Nor Hayati O, Ravinderan A. Prevalence and type distribution of Human papillomavirus(HPV) in Malaysian women with and without cervical cancer. Bioscience Reports. 2018; 38(2): 25-34.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:50 +0330 on Sunday March 10th 2019

25. Giuliano AR PM, Denman CA, Zapien JG, Abrahamsen M, Hunter JB. Human papillomavirus infection at the united states-Mexico border. Implications for cervical cancer prevention and control. Cancer Epidemiol Biomarkers prev. 2001; 10: 1129-36.

26. Luis Francisco S-A. Human papillomavirus infection in women seeking cervical papanicolaou cytology of Durango, Mexico: Prevalence and genotypes. BMC Infect Dis. 2006; 6: 27. https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-27

27. Mighty KK, Laimins LA. The role of Human papillomaviruses in oncogenesis. Viruses and Human Cancer. 2014; 2:135-48. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38965-8_8

28. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human papillomavirus genetic basis of carcinogenicity. Public Health Genomics. 2009; 12(5-6): 281-90. https://doi.org/10.1159/000214919

29. Jamshidi Makiani MJ, Minaeian S, Moghaddam SA, Moosavi SA, Moeini Z, Zamani V, et al. Relative frequency of Human papillomavirus genotypes and related sociodemographic characteristics in women referred to a general hospital in Tehran, 2014-2015. International Journal of Reproductive Biomedicine. 2017; 15(5): 305-10. https://doi.org/10.29252/ijrm.15.5.305

30. Taghizadeh E, Taheri F, Abdolkarimi H, Ghorbani Renani P, Gheibi Hayat S M. Distribution of Human papillomavirus genotypes among women in Mashhad, Iran. Intervirology. 2017; 60: 38-42. https://doi.org/10.1159/000477848

31. Monsefi N, Sh D, Abbaszadeh M. Frequency of Dysplastic and Cancerous Pap Smear and Genotyping of Human Papillomavirus by DNA Probetechniques in Kerman, Iran. Journal of Kerman University of Medical Sciences. 2013; 20(5): 450-9.

32. Coser J B, wolf JM, Cerbaro k, Simon D, Lunge vr. Cervical Human papillomavirus infection and persistence: clinic-based study in the countryside from south Brazil. Braz J infect dis. 2016; 20(1): 61-8. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.008

33. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003; 16: 1-17. ttps://doi.org/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003

34. Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: Burden of illness and basis for prevention. AJMC. 2006; 12(17): 462-72.

35. Abike F, Bingöl B, Yılmaz A, Temizkan O, Tapısız ÖL, Dunder İ. HPV infection and HPV subtypes in normal and abnormal cervical cytology in Turkish women. Journal of Virol Microbiology. 2013; 1-7.

36. Speich N, Schmitt CH, Bollmann R, Bollmann M. Human papillomavirus's study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing of patients from the West German area. Journal of medical microbiology. 2004; 53(2): 125-8. https://doi.org/10.1099/jmm.0.05447-0

37. Malary M, Moosazadeh M, Hamzehgardeshi Z, Afshari M, Moghaddasifar I, Afsharimoghaddam A. The prevalence of cervical human papillomavirus infection and the most at-risk genotypes among Iranian healthy women: A systematic review and meta-analysis. International Journal of Preventive Medicine. 2016; 7: 70. ttps://doi.org/10.4103/2008-7802.181756

38. Zandi,K, Eghbali S S, Hamkar R, Ahmadi SH , Ramedani E, Deilami I, et al. Prevalence of various Human Papillomavirus (HPV) genotypes among women who subjected to routine Pap smear test in Bushehr city (South west of Iran)2008-2009. Virology journal. 2010; 7: 56. https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-65

www.SID.ir