فراوانی پاپیلوما ویروس‌های تیپ ۱۶ و ۱۸ در زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم به روش Multiplex-PCR

مجتبی ساده[۱]، سروناز فلسفی[۲]، کیومرث امینی*[۳]

۱- متخصص باکتری‌شناسی پزشکی، دپارتمان میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲-استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳-دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۴ / زمستان ۹۷ / مسلسل ۷۸

چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۸/۱ پذیرش مقاله: ۹۷/۹/۱۲

مقدمه: زنان آلوده به پاپیلومای ویروس انسانی به ویژه تیپ ۱۶ و ۱۸ در خطر کسب سرطان دهانه رحم هستند. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ و ۱۸ در زنان با سرطان دهانه رحم با استفاده از روش Multiplex-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پس از جمع‌آوری نمونه‌های خون، DNA ویروسی با استفاده از کیت سیناکلون استخراج و PCR با پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی ژنوتایپ HPV-16 و HPV-18 انجام شد. محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: از میان تمامی ۶۰ نمونه تحت مطالعه تعداد ۱۹ مورد با عفونت HPV آلوده بودند. نتایج نشان داد که فراوانی ژنوتیپ HPV-16 و HPV-18 به ترتیب ۸ (۴۲٪/۱) و ۱۱ (۵۷/۹ ٪) موارد بود.

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که PCR با پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی HPV-16 و HPV-18 یک روش مناسب و دقیق است. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده ارتباط بین HPV و سرطان دهانه رحم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان دهانه رحم، ویروس پاپیلومای انسانی، Multiplex -PCR.

*آدرس مکاتبه: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.

پست الکترونیک: dr_kumarss_amini@yahoo.com

مقدمه

سرطان دهانه رحم دومین علت مرگ و میر در اثر سرطان در بین زنان می‌باشد (۱). این سرطان بیش از هر نوع سرطان بدخیم دیگری، اثرات پیش‌گیری، تشخیص زودرس و درمان به موقع بر کاهش میزان مرگ و میر ناشی از آن مشهود می باشد (۲). اتیولوژی و پاتوژنز دهانه رحم شامل عوامل متعدد محیطی و ژنتیکی است که منجر به ترانسفرماسیون سلول‌های اپی‌تلیالی می‌شود. مهم‌ترین و شناخته شده‌ترین علل محیطی ایجاد این سرطان، ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) می‌باشد که در سال ۱۹۷۰ میلادی به عنوان عامل اصلی بروز سرطان دهانه رحم معرفی گردید (۳). پاپیلوماویروس‌ها (PVs) گروه کوچکی از ویروس‌های بدون پوشش با DNA دو رشته‌ای هستند. این ویروس‌ها سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی را در نواحی مختلف آلوده می‌کنند (۴). از نظر ویروس‌شناسی، پاپیلوماویروس به گروه ویروس‌های برهنه (فاقد پوشش) با کپسید ۲۰ وجهی متعلق است و دارای ۸ ژن اولیه و تنظیمی و ۲ ژن ساختمانی L1 و L2 کپسید با بیان تأخیری می‌باشند (۵). از میان ۸ ژن تنظیمی، ژن‌های E6 و E7 توانایی ویروس در تبدیل ضایعه به کارسینومای سرویکس را مشخص می‌نماید. بنابراین اولین قدم ضروری در تشخیص حضور ویروس در نمونه دهانه رحم و سایر نمونه‌های به دست آمده از بیمار، جداسازی DNA ویروس می‌باشد (۶). تاکنون در حدود ۸۰ زیر گروه از این ویروس شناخته شده‌اند که ۲۰ نوع آنها در ایجاد سرطان دهانه رحم درگیر هستند (۷). این ویروس‌ها به دو تیپ از نظر توانایی بالقوه در ایجاد سرطان تقسیم می‌شوند، تیپ‌های High-risk و Low-risk. اکثر ویروس‌های پاپیلومای آلوده‌کننده دهانۀ رحم و نواحی آنوژنیتال از انواع High-risk بوده و توانایی تبدیل‌شدن به سرطان دهانۀرحم (کارسینومای سرویکس) را دارند (۸). عفونت‌های آنوژنیتال به فرم زگیل، کندیلوما آکومیناتا، ضایعات مخاط دهانۀ رحم (CIN) ظاهر می‌شود (۹). لیکن مطالعات اپیدمیولوژیک و مولکولی نشان داده‌اند که تنها ۱۵ تیپ (۱۶،۱۸،۳۱،۳۳،۳۵،۳۹،۴۵،۵۱،۵۲،۵۶،۵۸،۵۹،۶۸،۷۳،۸) که به تیپ‌های پرخطر معروف هستند، سرطان‌زا می‌باشند (۱۰). در میان انواع HPV پرخطر، به عنوان عوامل سبب شناختی برای سرطان گردن رحم، عفونت HPV-۱۶ و HPV-۱۸ به‌صورت جمعی حدود ۷۰٪ از بار سرطان دهانه رحم را شامل می‌شود. در مقایسه با دیگر مناطق جهان، تا ۹۰٪ از ضایعات سرطان گردن رحم در زنان، از نوع خاص HPV-۱۶ می‌باشد (۱۱). در بررسی های جهانی HPV-۱۶ در مقایسه با دیگر انواع HPV پرخطر، نقش عمده ای را در عفونت نشان می‌دهد (۱۲). این احتمال وجود دارد که عواملی مانند تعداد کپی‌های ویروسی و حالت فیزیکی ژنوم ویروسی پیامدهای بالینی مهم در تداوم ویروس و پیشرفت سرطان گردن رحم داشته باشد (۱۳). فقدان توانایی کشت پاپیلوماویروس‌ها، سبب شده که شناسایی اولیه این ویروس‌ها مشکل شود. بنابراین روش‌های مولکولی بهترین گزینه می‌باشند و در میان این روش‌ها، روش‌هایی بر پایه آمپلی‌فیکاسیون با PCR به دلیل سهولت انجام، پرکاربردتر هستند. هدف از مطالعه پیش‌رو، تعیین فراوانی پاپیلوماویروس‌های تیپ ۱۶ و ۱۸ در زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم به روش Multiplex-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی-مقطعی است که از ابتدای مهرماه سال ۱۳۹۵ تا انتهای خرداد سال ۱۳۹۶ انجام شد. در این مطالعه ۶۰ نمونه خون به صورت کاملاً تصادفی از زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم مراجعه کننده به بیمارستان شهید فیاضی بخش البرز اخذ گردید. معیار ورود افراد به مطالعه بررسی های بافت شناسی (پاتولوژیک) و تایید وجود سرطان دهانه رحم زیر نظر پزشک متخصص زنان و زایمان بود. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری شرکت سیناکلون انجام شد. پس

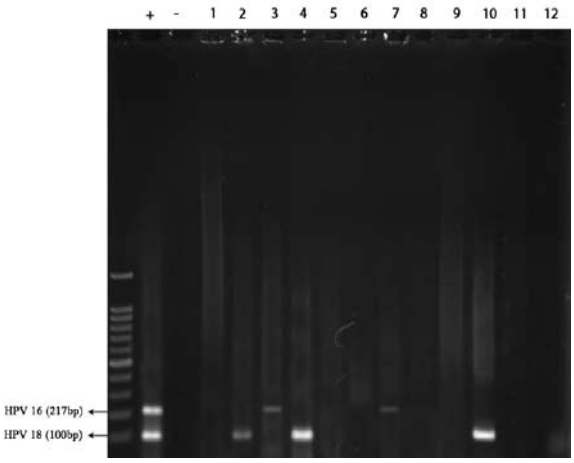
از BLAST آغازگرهای انتخاب‌شده در سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۵/۵ میکرو لیتر PCR master mix 5X (سینا کلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/µl)، MgCl2 3 mM) و dNTPs (0.4mM)، یک میکرو لیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرو لیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر(اپندورف، آلمان) برای ۳۴ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید: گام اول واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر ۵۶ درجه برای ۳۰ ثانیه، گام سوم بسط اولیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ٪۱ حاوی اتیدیوم بروماید (0.5 µg/ml) الکتروفورز گردید.

جدول ۱. توالی‌های پرایمری استفاده شده در این مطالعه

تیپ ویروس		توالی `۳-`۵	طول باند (bp)	رفرنس
HPV-16	F	AAGGCCAACTAAATGTCAC	2017	(۱۰)
	R	CTGCTTTTATACAACCGG		
HPV-18	F	ACCTTAATGAAAAACCACGA	100	
	R	CGTCGTTTAGAGTCGTTCCTG		

یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد که اجرای فرآیند Multiplex-PCR برای شناسایی DNA ویروس HPV در نمونه‌ها مناسب است. میانگین سنی بیماران تحت مطالعه ۰/۳± ۲۶/۴ سال و در محدوده سنی ۱۸ تا ۵۶ سال قرار داشتند. از مجموع ۶۰ نمونه تحت بررسی، تعداد ۱۹ نمونه (٪۳۱/۶) ازنظر وجود ژنوم ویروس پاپیلوما مثبت بود. که ۸ نمونه (٪۴۲/۱) مربوط به تایپ ۱۶ و ۱۱ نمونه (٪۵۷/۸) از نوع HPV-۱۸ بودند. در هیچ کدام از نمونه‌های تحت مطالعه هر دو ژنوتیپ ویروس به طور همزمان شناسایی نشدند.



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی. کنترل منفی؛ آب مقطر، کنترل مثبت؛ سویه‌های کنترل مثبت، DNA سایز مارکز، ۱۰۰bp.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات مورد شاهدی که تاکنون انجام گرفته عفونت با HPV به عنوان عامل اصلی توسعه نئوپلازی و بدخیمی در اپی‌تلیال ناحیه تناسلی شناسایی شده است و به ویژه زمانی که عفونت پایدار با تیپ‌های پرخطر این ویروس صورت گرفته باشد این مسئله بارزتر خواهد بود (۱۲). این ویروس‌ها به دو تیپ از نظر توانایی بالقوه در ایجاد سرطان تقسیم‌بندی می‌شوند: تیپ‌های High-risk و Low-risk. معمول‌ترین تیپ HPV انواع ۶ و۱۱ هستند، اما عفونت با تیپ ۱۶ و ۱۸ نیز معمول می‌باشد (۱۳).

در مطالعه پیش رو، از ۶۰ نمونه خون به دست آمده از زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم، ۱۹ نمونه (٪۳۱/۶) ازنظر وجود HPV مثبت بودند. فراوانی ژنوتیپ تیپ ۱۶ و ۱۸ به ترتیب برابر ۸ (٪۴۲/۱) و ۱۱ (٪۵۷/۹) موارد بود. هیداوی و همکاران در هندوستان با بررسی ۲۵۲ بیمار مبتلا به سرطان دهانه رحم نمونه مثبتی از HPV شناسایی نکردند (۱۴). همچنین، پیتر و همکاران نیز از ۵۰ نمونه سرطان آندوسرویکس در بیماران فرانسوی هیچ نمونهDNA از HPV را مشاهده نکردند (۱۵). مرادی و همکاران به بررسی مولکولار اپیدمیولوژی پاپیلوماویروس انسانی و انواع پر خطر آن (HPV-۱۶ و HPV-۱۸) در بافت سرطانی رحم در استان گلستان پرداختند. در

مطالعه این محققین از مجموع ۲۳۱ نمونه جمع‌آوری شده تعداد ۱۲۲ نمونه از گرگان و ۱۰۹ نمونه از گنبد جمع‌آوری شدند. در هیچ یک از نمونه‌ها موردی از آلودگی به پاپیلوماویروس یافت نشد (۱۶). سوزتک و همکاران به ردیابی ویروس پاپیلومای انسانی (HPV)، سیتومگالوویروس (CMV)، ویروس اپشتین بار (EBV)، ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ و ۲ (HSV-1 و HSV-2) و هرپس ویروس انسانی تایپ ۸ (HHV -۸) در ۶۹ بیمار مبتلا به سرطان رحم و نمونه‌های غیرسرطانی و یا سایر افراد با تومورهای تیروئید یا فیبروآدنوم مورد بررسی قراردادند (۱۷). این محققین ۸ مورد (۹/۱۲٪) HSV-1، ۲۸ مورد (۲/۴۵٪) EBV، ۴۷مورد (۸/۷۵٪) CMV، ۸ مورد (۹/۱۲٪) HPV، و ۲۸ مورد (۲/۴۵٪) HHV-8 شناسایی شد. جبارپور و همکاران شیوع HPV-16 را در ۷۵ بیمار دارای ضایعات سرطان سرویکس ۶۴٪ گزارش نمودند (۱۸). جهادی و همکاران شایع‌ترین نوع HPV را در زنان مبتلابه سرطان دهانه رحم از نوع ۱۶ معرفی نمودند (۱۹). از دلایل اختلاف در نتایج مطالعه بالا با داده‌های پیش رو می‌توان به مرحله تشخیص بیماری، وجود سیستم‌های غربالگری بیماران از نظر وجود مارکرهای انکوژنی و انکوپروتئین‌ها، سطح بهداشت و اختلافات جغرافیایی را نام برد.

از آنجائی که این ویروس علائم و نشانه‌ای ندارد و با توجه شیوع بالای آن در ایران، تشخیص به موقع و درمان سریع آن می‌تواند از تبدیل زخم‌های پیش سرطانی به سرطان پیشرفته جلوگیری نماید. روش‌های مولکولی مانند PCR می‌تواند روش سریع و مطمئن برای تشخیص بیماری در مراحل اولیه بیماری باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از همکاران محترم بخش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه و مرکز پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد تقدیر و تشکر نمایند.

References

1. Baliga MS, Dsouza JJ. Amla (Emblica officinalis Gaertn), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. European Journal of Cancer Prevention. 2011;20(3):225-239.
2. Howley PM. Human Papillomaviruses and Cancer. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2018;13(1): 11-16.
3. Roberts CC, Tadesse AS, Sands J, Halvorsen T, Schofield TL, Dalen A, et al. Detection of HPV in Norwegian cervical biopsy specimens with type-specific PCR and reverse line blot assays. Journal of clinical virology. 2006;36(4): 277-282.
4. Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. BMC Infectious diseases. 2009;9(1):2334-2339
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer. 2015: 1;136(5):E359-86.
6. Schiffman, Mark, and Nicolas Wentzensen. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. 2013: 553-560.
7. Zutshi V, Dankher S, Malik A. Cervical Cancer Screening and Prevention: An Analysis of Beliefs and Predictors of Knowledge, Attitude and Practice in Northern India. Indian Journal of Gynecologic Oncology. 2017 Dec 1;15(4):71-74
8. Singh A, Datta P, Jain SK, Bhatla N, Gupta SD, Dey B, et al. Human papilloma virus genotyping, variants and viral load in tumors, squamous intraepithelial lesions, and controls in a north Indian population subset. International Journal of Gynecological Cancer. 2009;19(9):1642-1648.
9. Shukla S, Bharti AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. 2009;130(2):222-233.
10. Arora R, Kumar A, Prusty BK, Kailash U, Batra S, Das BC. Prevalence of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) types 16 and 18 in healthy women with cytologically negative Pap smear. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2005;121(1):104-109.
11. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sørensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. The Lancet. 2000;355(9222):2189-2193.
12. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clinical microbiology reviews. 2003;16(1):1-17.
13. Kojic EM, Conley L, Bush T, Cu-Uvin S, Unger ER, Henry K, Hammer J, Escota G, Darragh TM, Palefsky JM, Brooks JT.

Prevalence and Incidence of Anal and Cervical High-Risk Human Papillomavirus (HPV) Types Covered by Current HPV Vaccines Among HIV-Infected Women in the SUN Study. The Journal of infectious diseases. 2018 Feb 14;217(10):1544-1552.

14. Katiyar S, Hedau S, Jain N, Kar P, Khuroo MS, Mohanta J, Kumar S, Gopalkrishna V, Kumar N, Das BC. p53 gene mutation and human papillomavirus (HPV) infection in esophageal carcinoma from three different endemic geographic regions of India. Cancer Lett. 2005 Jan 31; 218(1):69-79.
15. Peter M, Stransky N, Couturier J, Hupé P, Barillot E, de Cremoux P, Cottu P, Radvanyi F, Sastre-Garau X. Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. The Journal of pathology. 2010: 1; 221(3):320-330.
16. Moradi A, Mobasheri E, Tabarraei A, Bakhshandeh Nosrat S, Azarhosh R, Alizadeh SH, Bazori M. Molecular epidemiology of Human Papillomaviruses in breast cancer, Golestan province of Iran. Medical Laboratory Journal. 2009: 15;3(1):0-0 (In Persian).
17. Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, Kosz-Vnenchak M. Herpes viruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. Acta Biochim Pol. 2009; 56(2):337-342.
18. Jabbarpour Bonyadi M, Esmaeili M, Dasranj A. Determine the types of human papillomavirus oncogene multiplex PCR in cervical cancer lesions in North West of Iran. Article in Persian] J Infect Dis. 2008; 13(41):29-34 (In Persian).
19. Jahdi F, Khademi K, Merghati Khoei E, Haghani H, Yazdanpanahi Z. Evaluation of the Individual and Medical Factors Associated With Genital Human Papillomavirus in Iranian Women. Scimetr. 2014; 2(4): e17495 (In Persian).

The Prevalence of Papillomavirus-16 and -18 isolated from women with cervical cancer using Multiplex PCR

Sadeh M [1], Falsafi S[2], Amini K [*3]

1. Microbiology Group, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran.

2.Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Advance Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3. Associate Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran, dr_kumarss_amini@yahoo.com.

Received: *23 Oct 2018* Accepted: *3 Dec 2018*

Abstract

Background: Women infected with human papillomavirus, especially types 16 and 18, are at risk of cervical cancer. The purpose of this study was to determine the frequency of papillomavirus-16 and -18 in women with cervical cancer using multiplex-PCR.

Materials and Methods: In this experimental study, after collecting blood samples, viral DNA was extracted using a Cinaclone kit, and PCR, with specific primers, was performed to detect HPV-16 and HPV-18. PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis.

Results: Of 60 samples, 19 were infected with HPV. The results showed that the frequency of genotype HPV-16 and HPV-18 was 8 (42.1%) and 11 (57.9%), respectively.

Conclusion: The study showed that using PCR with specific primers for the detection of HPV-16 and HPV-18 is a convenient and accurate method. The results of this study indicate the relationship between HPV and cervical cancer.

Keywords: Cervix cancer, Human Papilloma Virus, Multiplex-PCR.

Citation Sadeh M. Falsafi S, Amini K. The Prevalence of papillomavirus-16 and 18 isolated from women with cervical cancer by Multiplex-PCR. Yafte.2018; 20(1):1-7.