Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۴۰۰(شماره پی در پی ۱۴۶)

بررسی شیوع پاپیلوما ویروس انسانی با روش Blot Hybridization Multiplex PCR & Reverse Dot در زنان دارای پاپ اسمیر غیر طبیعی مراجعه کننده به کلینیک فوق تخصصی شهید مفتح شهر یاسوج

پروین غفاری[1]، رامین جان‌نثار[2]، محمد ذوالعدل[3]، راضیه قدمی[4]

[1]گروه زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [2] گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [3] گروه روان پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [4] کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰۷/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: پاپیلوما ویروس‌انسانی شایع‌ترین بیماری منتقله از طریق تماس جنسی و ریسک فاکتور اصلی ایجاد ضایعات پیش‌بدخیم و بدخیم در سرویکس است. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی شیوع پاپیلوما ویروس انسانی با روش Multiplex PCR & Reverse Dot Blot Hybridization ، در زنان دارای پاپ اسمیر غیر طبیعی مراجعه کننده به کلینیک فوق تخصصی شهید مفتح در شهر یاسوج بود.

روش پژوهش: این مطالعه به صورت توصیفی- تحلیلی می‌باشد که طی سال‌های ۱۳۹۶ــ ۱۳۹۴ انجام گرفت. در مجموع ۶۷ نمونه سیتولوژی سرویکس غیرطبیعی شامل ۵۱ نمونه ASC-US، ۹ نمونه LSIL و ۷ نمونه HSIL جمع‌آوری شده و با روش Multiplex PCR & Reverse Dot Blot Hybridization بررسی شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون کای مربع، تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: شیوع کلی پاپیلوما ویروس انسانی HPV(۶۱/۲ درصد) بود. ۳۶(۸۷/۸ درصد) زن به تیپ‌های پرخطر پاپیلوما ویروس انسانی ، ۲۶(۶۳/۴درصد) به تیپ‌های کم‌خطر و ۲ (۴/۹درصد) به تیپ‌های نامشخص آلوده بودند. شایع‌ترین تیپ‌های پرخطر به ترتیب HPV 39(۴۳/۹درصد)، HPV66 (۳۱/۷درصد)، HPV31(۲۶/۸درصد) و HPV18 (۱۴/۶درصد) بود. HPV16 فقط در ۲ نمونه (۴/۹درصد) شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر شیوع بالایی از عفونت پاپیلوما ویروس در زنان دارای پاپ اسمیر غیرطبیعی را نشان داد. علاوه بر این ژنوتایپ‌های پرخطر متفاوتی از این ویروس در مقایسه با پژوهش‌های دیگر در ایران شناسایی شد. جهت بررسی اپیدمیولوژی مولکولی و ژنوتایپ‌های پاپیلوما ویروس انسانی، نمونه‌های بیشتری با جغرافیای گسترده تر مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: پاپیلوما ویروس انسانی، پاپ اسمیر ، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ، هیبریداسیون دات بلات معکوس

*نویسنده مسئول: **پروین غفاری، یاسوج،** دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، گروه زنان و زایمان

Email: pari.ghaffari@gmail.com

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

مقدمه

سرطان دهانهٔ رحم، دومین بدخیمی شایع و از عوامل مهم مرگ و میر در زنان سراسر جهان است و به عنوان تهدیدی جدی برای سلامت زنان محسوب می شود(۱). میزان ابتلاء به سرطان دهانه رحم در کشورهای در حال توسعه، به علت به اجرا گذاشته نشدن برنامه‌های غربالگری مؤثر به تدریج رو به افزایش است. از عوامل مرتبط با سرطان گردن رحم می‌توان به سن، نژاد، داشتن چند شریک جنسی، مصرف طولانی مدت قرص‌های ضد بارداری، ضعف سیستم ایمنی و آلودگی با عوامل عفونی اشاره کرد(۲).

گزارش‌های متعدد ارتباط بین گروهی از DNA ویروس‌های انکوژنی را با توسعهٔ بدخیمی‌ها در جمعیت‌انسانی نشان می‌دهد که از مهم‌ترین و شناخته شده‌ترین آنها آلودگی با پاپیلوماویروس‌ها(HPV) است(۳). پاپیلوماویروس‌ها جزء بزرگترین خانواده ویروس‌ها منتقله از راه جنسی(STD) است که اپی‌تلیوم سطحی پوست و مخاط را آلوده می‌کنند(٤).

شواهد علمی نشان داده‌اند که سرطان سرویکس می تواند در نتیجه عفونت طولانی مدت با ژنوتیپ‌های پرخطر از HPV به وجود آید. تا کنون بیش از ۱۵۰ ژنوتیپ مختلف از این ویروس‌ها شناخته شده‌است که ٤۰ ژنوتیپ از آنها به عنوان HPV تناسلی مخاط آنوژنتیال را آلوده می‌کنند که بر اساس پتانسیل ایجاد بدخیمی به ژنوتیپ‌های کم‌خطر و پرخطر دسته‌بندی می‌شوند. HPVهای ١٦ و ١٨ تیپ‌های پرخطر غالب در سرطان سرویکس در دنیا هستند(٥).

بالاترین شیوع HPV در سال‌های اولیه شروع فعالیت جنسی است. این عفونت‌ها در سال ۲۰۱۲ منجر به ٥١٠٠٠٠ مورد سرطان گردن رحم و تقریباً ۲۸۸۰۰۰ مورد مرگ شده اند(۷ و٦). بالاترین میزان شیوع شامل ۲۱درصد در آفریقا و ١٦درصد در آمریکای لاتین و کارائیب تا ۹درصد در آسیا و ٥ درصد در آمریکای شمالی است(۹و ۸). سرطان سرویکس در بین کل سرطان‌های زنان ایرانی در رتبه یازدهم قرار دارد، با این حال در استان‌های خراسان شمالی، گلستان، مازندران و کهگیلویه و بویراحمد رتبه ۸ـ۷ دارد، در سال ۲۰۰۹، ۲۸٦ زن ایرانی به دلیل سرطان پیشرفته سرویکس فوت شدند(۱۱ و ۱۰).

طبق پژوهش‌های انجام شده در کشور، میزان شیوع نتایج پاپ اسمیر غیرطبیعی با میزان رشد ٤ـ۲ برابری نسبت به گذشته رو به افزایش است و درصد بالایی از بیماران مبتلا به سرطان سرویکس در کشور به HPV آلوده هستند(۹)، از طرفی در مورد شیوع HPV و تفاوت‌های استانی توزیع ژنوتیپ‌های آن، اطلاعات کافی در جمعیت ایران وجود ندارد. در همین راستا با توجه به عدم آگاهی از شیوع HPV و توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف آن در زنان دارای پاپ اسمیر غیرطبیعی در شهرستان بویراحمد، بررسی فراوانی و تعیین ژنوتیپHPV برای تشخیص به موقع پیشرفت ضایعاتی که به سمت بدخیمی سوق داده می‌شوند و طراحی واکسن‌های متناسب با جمعیت‌های مورد مطالعه بسیار مهم است. از آن جا که با استفاده از روش‌های سرولوژیک و کشت سلولی، امکان تشخیص این ویروس و انواع آن وجود ندارد، در تشخیص دقیق، قطعی و زودهنگام این ویروس، روش‌های

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

مولکولی اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. در همین راستا این مطالعه با هدف تعیین فراوانی و ژنوتیپ ویروس پاپیلومای انسانی با روش Multiplex PCR & Reverse Dot Blot Hybridization با قابلیت شناسایی ۳۶ ژنوتیپ HPV صورت گرفت.

روش بررسی

این مطالعه به صورت توصیفی ـ تحلیلی انجام گرفت، در این مطالعه تعداد ٦٧ نمونه سیتولوژی سرویکس از زنان متأهل دارای پاپ اسمیر تأیید شده غیرطبیعی، از افراد مراجعه کننده به کلینیک شهید مفتح یاسوج به صورت تمام شماری در فاصلهٔ زمانی آذرماه ۱۳۹٤ تا شهریور ۱۳۹٦، مورد بررسی قرار گرفت. زنانی که دارای جواب پاپ اسمیر قبلی ASC-US، LSIL، HSIL بودند و تمایل به شرکت در مطالعه داشتند، وارد مطالعه شدند و آنهایی که در دوره قاعدگی، حاملگی و هیسترکتومی شده بودند و همچنین مقاربت جنسی طی ۲٤ ساعت قبل از نمونه‌گیری داشتند یا از داروهای واژینال یا دوش واژینال طی ٤٨ ساعت قبل از نمونه‌گیری استفاده کرده بودند، از مطالعه خارج شدند. با کسب رضایت از بیماران، نمونه برداری به وسیله پزشک متخصص و کارشناسان آزمایشگاه از سلول‌های اگزو و اندوسرویکس بیماران از طریق سیتوبرس نایلونی انجام شد. در این مطالعه از کیت تشخیصی ویروس پاپیلومای انسانی دایرکت فلوو چیپ محصول کمپانی شرکت مستر دیاگنوستیکا و روش واکنش زنجیره پلیمراز چندگانه و هیبریداسیون نقطه ای معکوس استفاده شد که طبق پژوهش‌های قبلی روشی ساده، سریع، با اختصاصیت بالا محسوب می‌شود(۱۲). کیت ویروس پاپیلومای انسانی دایرکت فلوو چیپ بر اساس تکثیر یک ناحیه ی محافظت شده از ژن L1 پاپیلوماویروس‌انسانی و برای استفاده مستقیم از نمونه‌های بالینی و بدون نیاز به استخراج قبلی DNA بهینه سازی شده‌است و حاوی تمام واکنش‌دهنده‌های لازم جهت واکنش زنجیره پلیمراز چندگانه و هیبریداسیون نمونه بالینی است. مراحل انجام آزمایش شامل دو مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و مرحلهٔ هیبریداسیون نقطه ای معکوس به شرح زیر بود.

در این مرحله ٥ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی لایز شده ی نمونه سیتولوژی به دست آمده را به عنوان الگوی DNA با ٤٥ میکرولیتر بافر آماده برای واکنش PCR که شامل هات استار دی ان ای پلی مراز میکس است، مخلوط کرده، سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترموسایکلر قرار دادیم و عمل PCR براساس جدول ۱ انجام شد. در این مرحله DNA های پاپیلوما ویروس در مجاورت پرایمرهای اختصاصی قرار گرفت و باعث تکثیر قطعاتی از ناحیهٔ L۱ ژنوم ویروس پاپیلوی انسانی شد.

پس از عمل PCR، محصولات PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر در دمای ۹٥ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه دناتوره شد، سپس محصول PCR نشان‌دار شده با بیوتین با استفاده از دستگاه هیبری اسپات ۱۲ ام تی و با کمک تراشه‌های مخصوص که از جنس غشای نایلونی بوده و حاوی پروب‌های ۳٦ ژنوتیپ مختلف پاپیلوما ویروس هستند، در مجاورت معرف‌های مخصوص شامل محلول هیبریداسیون،

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

محلول بلوکه کننده، محلول استرپتاویدین آلکالین فسفاتاز و بافرهای مخصوص قرار گرفته و با ایجاد پیوند بین تک رشته‌های DNA با پروب‌های مکمل بی‌حرکت شده پاپیلومای ویروس، در یک محیط سه بعدی باعث تشکیل رسوبی به رنگ بنفش تیره در محل هیبریداسیون پروب‌های مخصوص با محصول PCR شد. سپس از تراشه‌ها عکس گرفته و با کمک نرم‌افزارهیبری سافت آنالیز شد. لازم به ذکر است است که تراشه‌های کیت در سطح خود علاوه بر ژنوتیپ‌های مختلف، نقاطی دارند که دارای کنترل کیفی از نوع کنترل مثبت، کنترل منفی و کنترل داخلی است که تفسیر صحیح نتایج را تضمین می‌کند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری کای مربع، تجزیه و تحلیل شدند. برای توصیف داده‌ها از شاخص‌های مرکزی و پراکندگی و رسم نمودارها و جداول توزیع فراوانی استفاده شد.

یافته‌ها

در کل ٦٧ نمونه پاپ اسمیر غیرطبیعی جمع‌آوری شد که شامل ٥١ نمونه سلول های پوششی غیرطبیعی با اهمیت نامشخصASC-(US (٩ نمونه ضایعات غیرطبیعی سنگفرشی سرویکس با درجه پایین،(.LSIL) و ٧ نمونه ضایعات غیرطبیعی سنگفرشی سرویکس با درجه بالا.(HSIL) بودند. از مجموع ٦٧ نمونه، تعداد ٤١ مورد(٦١/٢درصد) به پاپیلوما ویروس مبتلا بودند که فراوانی نمونه‌های آلوده به HPV در نمونه سیتولوژیASC-US (٢٨/٥١) ٥٤/٩ درصد ، ٦٦/٧ درصد (٦/٩) .LSIL و در HSIL ١٠٠درصد(٧/٧) بود. در تمام نمونه‌های HSIL (١٠٠ درصد نمونه‌های این گروه)، HSIL[1] شناسایی شد. هم چنین بیشتر نمونه‌های بدون آلودگی به HPV از نظر پاتولوژی در گروه‌های ASC_US [2] و LSIL[3] بودند.

بر اساس گروه‌های سنی دسته‌بندی شده، ٢٠ نفر در گروه سنی کمتر از ٣٠ سال، ٢٣ نفر در گروه ٤٥ـ٣١سال و ٢٤ نفر در گروه بیشتر و مساوی ٤٦ سال قرار گرفتند. فراوانی نمونه‌های آلوده به HPV در گروه ASC-US، LSIL، HSIL سنی کمتر از ٣٠ سال ٦٥ درصد ، گروه سنی ٤٥ـ٣١ با ٥٢/١٧ درصد و گروه بیشتر از ٤٦ سال ٦٦/٦ درصد بود.

در کل ١٦ ژنوتیپ مختلف HPV در نمونه‌های آلوده به این ویروس شناسایی شد که دو نمونه از نمونه‌ها به وسیله پنل chip قابل تایپینگ نبود. جدول ٢ توزیع فراوانی ١٤ ژنوتیپ مختلف شناسایی شده در این پژوهش را به تفکیک نتیجه پاپ اسمیر نشان می‌دهد. با توجه به تعدد ژنوتیپ در برخی زنان، فراوانی تیپ‌های پرخطر و کم خطر در پاپ اسمیر غیرطبیعی به ترتیب ٨٧/٨٧ درصد(٣٦/٤١) و ٦٣/٤درصد(٢٦/٤١) بود. HPV6 شایع ترین ژنوتیپ در کل نمونه‌های آلوده به HPV بود که جز تیپ‌های کم‌خطر است و پس از آن ٦ ژنوتیپ ٣٩، ٦٦، ٣١،

1-High Grade Squamous Intraepithelial Lesion(HSIL)
2-Atypical Squamous Cell Undetermined Significance(ASC-US)
3-Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion(LSIL)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

۱۸، ٤٥، ٥١ بـه ترتیـب شـایع‌تـرین ژنوتیـپ‌هـای شناسایی شده بودند که همگی پرخطر هسـتند. از بـین ژنوتیپ‌های پرخطر، HPV39 با شناسایی در ۱۸ نمونـه شایع‌ترین ژنوتیپ پرخطر بـود. HPV18 در ٦ نمونـه و HPV16 تنهـا در ۲ نمونـه وجـود داشـت. هـر یـک از ژنوتیپ‌های پرخطر ٥۲ و ٥۹ و ژنوتیپ‌هـای کـم‌خطـر ٥٤ و ۸۹ به طور مجزا در یـک نمونـه شناسـایی شـد. درصد فراوانی نمونه‌های دارای آلودگی هـم‌زمـان بـه چند ژنوتیپ HPV دربین موارد مثبت، ٦۸/۳ درصد بود به تفکیک نتیجه پاپ اسمیر، آلودگی هم‌زمـان بـه چنـد ژنوتیپ در نمونه‌های سیتولوژی ASC_US بیشتر و در نمونه‌های HSIL کمتر بود.

بحث

پاپیلومـاویروس‌هـا جـزء بزرگتـرین خـانواده ویـروس‌هـا منتقلـه از راه جنسـی(STD) اسـت کـه اپـی‌تلیـوم سـطحی پوسـت و مخـاط را آلـوده می‌کنند(٤).شـواهد علمـی نشـان داده‌انـد کـه سـرطان سرویکس می تواند در نتیجه عفونت طولانی مـدت بـا ژنوتیپ‌های پرخطر از HPV به وجود آیـد(٥). هـدف از این مطالعه تعیین و بررسـی شـیوع پاپیلومـا ویـروس انسانی در زنان دارای پاپ اسمیر غیر طبیعی مراجعـه کننده به کلینیک فوق تخصصی شـهید مفـتح بـا روش Multiplex PCR & Reverse Dot Blot Hybridization در شهرستان بویراحمد بود.

جدول ۱ : برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش PCR

زمان	دما	تعداد سیکل	نام برنامه
۳ دقیقه	۹٤ درجه سانتی‌گراد	۱ سیکل	تک رشته ای شدن اولیه
۳۰ ثانیه	۹٤ درجه سانتی‌گراد		تک رشته‌ای شدن کلی
۳۰ ثانیه	٤۲ درجه سانتی‌گراد	۱٥ سیکل	اتصال آغازگر
۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد		سنتز DNA
۳۰ ثانیه	۹٤ درجه سانتی‌گراد		تک رشته‌ای شدن کلی
۳۰ ثانیه	٦۰ درجه سانتی‌گراد	۳٥ سیکل	اتصال آغازگر
۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد		سنتز DNA
٥ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱ سیکل	تکمیل سنتز DNA
۲۰ دقیقه	۸ درجه سانتی‌گراد		دمای نگه داری

جدول ۲: توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های پاپیلوما ویروس انسانی(HPV) به تفکیک نتیجه پاپ اسمیر

ژنوتیپ . HPV	ASCUS تعداد(درصد)	LSIL تعداد(درصد)	HSILتعداد(درصد)
HPV6	۲۱ (۷٥)	۱ (۱٦/٦)	۳ (٤۲/۸٥)
HPV39	۱۷ (٦۰/۷)	–	۱ (۱٤/۲)
HPV66	۸ ((۲۸/٥۷))	۲ (۳۳/۳)	۳ (٤۲/۸٥)
HPV31	۹ (۳۲/۱٤)	–	۲ (۲۸/٥۷)
HPV18	٥ (۱۷/۸٥)	–	۱ (۱٤/۲)
HPV45	٤ (۱٤/۲۸)	–	۲ (۲۸/٥۷)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

سرطان دهانه رحم در کشورهای در حال توسعه از شیوع بالایی برخوردار است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که عفونت با تیپ‌های پرخطر HPV، به عنوان عامل اصلی ایجاد نئوپلازی در اپی‌تلیال ناحیه تناسلی شناسایی شده است(۱۰). در مطالعه حاضر، نمونه سیتولوژی سرویکس زنان دارای پاپ اسمیر غیرطبیعی به منظور بررسی حضور عفونت ویروس پاپیلومای انسانی و ژنوتایپ های این ویروس جمع‌آوری و با روش Multiplex PCR & Reverse Dot Blot Hybridization مورد بررسی قرار گرفت که نشان دهنده میزان آلودگی ۶۱/۲ درصدی با ویروس پاپیلوما انسانی بود. این یافته با مطالعه غفاری در شهر تهران روی ۱۳٤ نمونه سیتولوژی طبیعی و غیرطبیعی و مطالعه اسماعیلی در شهر تبریز در ۱۳۳ نمونه بیوپسی پیش بدخیم و بدخیم سرویکس که شیوع کلی HPV را به ترتیب ٦۰ درصد و ٦٤ درصد گزارش کردند، مشابه است(١٤ و ١٣)، در حالی که شیوع نمونه‌های آلوده به HPV در مطالعه علامه(۱۵) در شهر اصفهان در ۱۳۰ نمونه سیتولوژی غیرطبیعی ۹۰/۸ درصد، در مطالعه فرجادیان(١٦) در شهر شیراز در ۱۰۱ نمونه کارسینوم سرویکس ۱/ ۸۷ درصد، در مطالعه کیمیایی(۱۷) در شهر تهران در ۵۸ نمونه سرطان سرویکس ۷۵/۹ درصد و در مطالعه مروری خرسندی (۱۸) در زنان ایرانی مبتلا به سرطان سرویکس، ۷٦درصد بود که از میزان شیوع کلی به دست آمده در این مطالعه بالاتر است. از طرفی در پژوهش‌های دیگر مانند مطالعه خداکرمی و همکاران شیوع HPV در نمونه‌های سیتولوژی غیرطبیعی ۳۵/۳درصد بود(۱۹). در مطالعه مورد ـ شاهدی صادقی در شهر بندرعباس روی ۵۲ نمونه کارسینوم سرویکس و ۵۲ نمونه دارای هیستوپاتولوژی طبیعی، ۳۰/۷ درصد بود(۲۰). در مطالعه نیاکان در شهر تهران که تنها شیوع HPV پر خطردر ۱۰۵ نمونه بیوپسی دارای ریسک متوسط تا بالا برای پیشرفت به سرطان سرویکس بررسی شد، ۲٤/۷درصد بود(۲۱). در مطالعه مهران در شهر رشت با روش مولکولی ۲۰درصد از زنان دارای سلول‌های غیرطبیعی حداقل به یک تیپ پرخطر HPV آلوده بودند(۲۲). در مطالعه حمیدی فرد در شهر اهواز ۱۳/۳ درصد از ٦۰ نمونه سرویکس به HPV پر خطرآلوده بودند(۲۳). همان طور که مشاهده می‌کنید، شیوع ویروس در این مطالعه بسیار شایع‌تر از پژوهش‌های ذکر شده در شهرهای بندرعباس، رشت، اهواز و و مطالعه نیاکان در تهران است. از دلایل اختلاف نتایج مطالعه حاضر با پژوهش‌های ذکر شده می توان حجم نمونه، روش‌های مورد مطالعه برای غربالگری، مرحله تشخیص نمونه، منطقه جغرافیای و سطح بهداشت و فرهنگ متفاوت نام برد. هم‌چنین مطالعه فرجادیان، کیمیایی و خرسندی بر روی نمونه‌های کانسر سرویکس انجام شده و میزان آلودگی بالاتر گزارش شده، در حالی که نمونه‌های مورد بررسی مطالعه حاضر بیشتر ASC_US بوده و شیوع آلودگی با HPV به طبع کمتر بوده است و می‌توان اختلاف در نتایج را به نوع نمونه‌های مورد بررسی ارتباط داد.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که عفونت HPV با شروع فعالیت جنسی افزایش می‌یابد و به بالاترین میزان در دوران نوجوانی و اوایل بزرگسالی می‌رسد و سپس در دهه دوم تا سوم افت می‌کند(۲٤). در حالی که بر اساس نتایج حاضر، فراوانی نمونه‌های آلوده به HPV در گروه سنی زیر ۳۰ سال و کمتر، هم‌چنین سن ٤٦ و بالاتر نسبت به گروه سنی ۳۱ تا ٤٥ سال بیشتر است.

با توجه به توجه و تمرکز گسترده به واکسن‌های HPV در دنیا، تعیین شیوع تیپ‌های مختلف و خصوصاً تیپ‌های پرخطر بسیار مهم است. حدوداً ٤۰ ژنوتیپ HPV مخاط آنوژنتیال را آلوده می‌کنند که پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱٦و۱۸ تیپ‌های پرخطر غالب در سرطان سرویکس در دنیا هستند(۲٥).در این مطالعه، ۱٦ ژنوتیپ مختلف HPV در ٤۱ نمونه سیتولوژی غیرطبیعی شناسایی شد که ژنوتیپ کم‌خطر ٦ و ژنوتیپ‌های پرخطر ۳۹، ٦٦، ۳۱، ۱۸، ٤٥، ٥۱، ٥٦ و ۱٦ به ترتیب شایع‌ترین ژنوتیپ‌های شناسایی شده بودند.

در مطالعه مروری خرسندی‌زاده پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱٦و۱۸ و ۳۱ با شیوع ٥٤ درصد، ۱٤ درصد و ٦ درصد به ترتیب شایع‌ترین ژنوتیپ‌ها در زنان ایرانی مبتلا به سرطان سرویکس گزارش شد(۱۸). در مطالعه متاآنالیز جلیل‌وند و همکاران که شامل نمونه‌های سیتولوژی طبیعی و غیرطبیعی و سرطان سرویکس بود، به ترتیب ژنوتیپ‌های ۱٦، ۱۱،٦،۱۸، ۳۱ و ۳۳ شایع‌ترین ژنوتیپ‌ها بودند(۲٦)، علاوه براین در مطالعه متاآنالیز گوان روی نمونه‌های سیتولوژی غیرطبیعی تا سرطان سرویکس، HPV16 شایع‌ترین ژنوتیپ گزارش شده بود(۲۷). در اکثر پژوهش‌های انجام شده در شهرهای مختلف ایران شامل مطالعه مرتضوی پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱٦با فراوانی ۷۳/۹ درصد شایع ترین ژنوتیپ بود و پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱۸ و ۳۳ در مجموع در ۱۱/٦ درصد از نمونه‌ها شناسایی شد(۹)، در مطالعه غفاری شیوع ژنوتیپ‌های پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱٦، ۱۸ ، ٦ و ۱۱ به ترتیب ۷٦ درصد، ۱۲/۷ درصد و ۸/٥ درصد بود(۱۳).

در مطالعه کیمیایی در نمونه‌های مورد مطالعه تنها دو ژنوتیپ ۱٦ و ۱۸ شناسایی شد و شیوع آنها را به ترتیب ٦۲ درصد و ۱٤درصد گزارش کردند(۱۷). بیشتر پزوهش‌هایی که به آنها اشاره شد، با استفاده از روش‌هایی با اساس PCR و دارای قابلیت شناسایی ژنوتیپ‌های ۱٦، ۱۸، ۳۱ و ۳۳ انواع نمونه‌های سیتولوژی غیرطبیعی و نمونه‌های بافتی سرطان سرویکس را بررسی کردند که در همگی پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱٦ به عنوان شایع‌ترین ژنوتیپ گزارش شد. در حالی که در این مطالعه پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱٦، هشتمین ژنوتیپ پرخطر بود که تنها در ۲ نمونه از ٤۱ نمونه آلوده به HPV شناسایی شد و به طور غیرمنتظره‌ای پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۳۹با شناسایی در ٤۳/۹ درصد، شایع ترین ژنوتیپ پرخطر بود. گرچه شیوع پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱٦در این مطالعه نسبت به آنچه در دنیا و

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

ایران گزارش شده متفاوت و کمتر است، ولی از طرفی ۲ نمونه آلوده به پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱۶در این مطالعه، یکی ضایعات غیرطبیعی سنگفرشی سرویکس با درجه پایین و دیگری ضایعات غیرطبیعی سنگفرشی سرویکس با درجه بالا بود که با توجه به تعداد کم ضایعات پیش بدخیم پیشرفته و عدم وجود نمونه سرطان سرویکس، جایی که پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱۶غالب است، توجیه‌پذیر است. نکته جالب این است که فراوانی ژنوتیپ پرخطر ۳۹ یعنی شایع‌ترین ژنوتیپ پرخطر شناسایی شده در این مطالعه از ۶۰/۷ درصد در سلول‌های پوششی غیرطبیعی با اهمیت نامشخص، به ۱۴/۲درصد در ضایعات غیرطبیعی سنگفرشی سرویکس با درجه بالا کاهش یافت. این روند در مطالعه گوان(۲۷)در دنیا نیز به چشم می‌خورد که با در نظر گرفتن تعداد بالای نمونه‌های سلول های پوششی غیرطبیعی با اهمیت نامشخص در این مطالعه، شاید دلیل دیگری برای مغایرت با سایر پژوهش‌ها باشد.

باید توجه داشت که میزان تنوع ژنتیکی در نواحی مختلف، به روش‌های مختلف در تعیین ژنوتایپینگ، استفاده از مارکرهای ژنتیکی متفاوت، استفاده از توالی‌های مختلف پرایمردر روش‌های HPV PCR که همه ژنوتیپ‌ها را با حساسیت مشابه تکثیر نمی‌کند، تعداد مارکرهای ژنتیکی مورد استفاده و ژنوتایپ غالب ویروس در نواحی و جمعیت‌های مختلف وابسته می‌باشد.

در این مطالعه تیپ‌های پرخطری غیر از پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱۶یا ۱۸ (۶۶، ۳۱، ۱۸، ۴۵، ۵۱) شایع بودند و با مطالعه فرجادیان و مطالعه شفقی هم‌خوانی دارد که پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱۶ و ۱۸ژنوتیپ‌های پر خطر شایع در جمعیت مورد مطالعه نبودند(۲۸ و۱۶). احتمالاً تشابه این مطالعه با مطالعه شفقی با در نظر گرفتن نوع نمونه‌گیری مشابه (سیتولوژی) و عدم وجود نمونه سرطان در هر دو مطالعه توجیه شود. یکی دیگر از ژنوتیپ‌های شناسایی شده در این مطالعه، پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱۸با شیوع ۱۴/۶درصد است که این میزان شیوع با پزوهش‌های حمیدی‌فرد، غفاری و خرسندی‌زاده مشابه است(۳۳ و ۲۳، ۱۸). ژنوتیپ دیگر پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۳۳است که در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نشد. این در حالی است که تعداد زیادی از پژوهش‌های انجام شده در کشور نیز این تیپ بررسی نشده است و در چند مطالعه نیز شیوع پایینی برای آن گزارش کردند، به طوری که مرتضوی ۱۱/۶درصد و اسماعیلی ۱درصد گزارش کردند(۱۴ و ۹). در مطالعه حمیدی فرد شیوع تیپ کم‌خطر پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۶ را ۲۵ درصد و در مطالعه علامه و غفاری شیوع آن را به همراه پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱۱ به ترتیب ۱۰ درصد و ۸/۵ درصد گزارش کردند(۲۳ و ۱۵، ۱۳). در حالی که در این مطالعه پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۶ با فراوانی ۶۱ درصد، شایع‌ترین ژنوتیپ شناسایی شده بود.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

نتایج حاضر نشان داد که در بین موارد مثبت آلوده به پاپیلوما ویروس درصد بالایی(۶۸/۳درصد) از زنان دارای سیتولوژی غیرطبیعی، به طور هم‌زمان به چند ژنوتیپ HPV آلوده هستند و جالب است که این یافته از سلول‌های پوششی غیرطبیعی با اهمیت نامشخص تا در ضایعات غیرطبیعی سنگفرشی سرویکس با درجه بالا کاهش می‌یابد که با مطالعه شفقی(۲۸)، کستل ساگو(۲۹)، دلگادو(۳۰) و هرهرو(۳۱)مشابه است. به نظر می‌رسد هنگامی که تغییرات پیش بدخیم پیشرفت می‌کند، یک تیپ HPV بر سایر تیپ‌ها غلبه می‌کند(۳۲). البته هنوز مشخص نیست که آیا آلودگی هم‌زمان به چند ژنوتیپ HPV ریسک پیشرفت به سرطان سرویکس را افزایش می‌دهد(۳۱).

با توجه با این که در بیشتر پژوهش‌های انجام شده در کشور، روش‌های به کار گرفته شده تنها قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های محدودی بودند و با توجه با این که در مطالعه شفقی(۲۸)، فرجادیان(۱۶) و این مطالعه تیپ‌های پرخطری غیر از پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱۶ یا ۱۸ (ژنوتیپ‌های هدف واکسن) شایع هستند؛ بنابراین لزوم به کارگیری روش‌هایی با توانایی شناسایی ژنوتیپ‌های بیشتر و خصوصاً ژنوتیپ‌های پرخطر که انواع جمعیت‌ها(جمعیت عمومی و سالم، زنان دارای سیتولوژی غیرطبیعی تا سرطان سرویکس) و تمام شهرهای کشور را پوشش دهد را به وضوح روشن می‌سازد، تا تفاوت‌های جغرافیایی توزیع ژنوتیپ‌ها در کشور مشخص شود و داده‌های به دست آمده، خصوصاً در مورد تیپ‌های پرخطر در جهت ساخت واکسن‌هایی متناسب با ژنوتیپ‌های غالب در کشور و ارایه برنامه‌های غربالگری مناسب به کار گرفته شود.

محدودیت‌های این مطالعه عدم وجود نمونه سرطان سرویکس در نمونه‌های مورد مطالعه بود و با توجه به تعداد کم نمونه، شیوع HPV و ژنوتیپ‌های آن در مطالعه حاضر را نمی‌توان به جمعیت عمومی تعمیم داد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان دهنده شیوع بالای HPV در جمعیت مورد مطالعه و هم‌چنین ژنوتیپ‌های پرخطر متفاوتی نسبت به سایر پژوهش‌ها در ایران و جهان بود؛ بنابراین لازم است HPV در این منطقه مورد توجه جدی قرار گرفته و پژوهش‌های مشابه با حجم نمونه بیشتر در سایر شهرستان‌های استان انجام شود تا شیوع دقیق این ویروس و ژنوتیپ‌های آن در استان مشخص شود. هم‌چنین با توجه به شیوع بالای HPV در جمعیت مورد مطالعه، باید راهکارهایی در جهت تشخیص سریع بیماران و درمان آنها، افزایش آگاهی، ارتقا بهداشت جنسی و راه‌های پیشگیری از انتقال در این جمعیت ارایه شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایانامه دوره دکترای عمومی با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1396.27 دانشگاه علوم پزشکی یاسوج می‌باشد. نویسندگان این مقاله از کلیه بیماران شرکت کننده و کارکنان آزمایشگاه که در این پژوهش همکاری صمیمانه داشتند کمال تشکر را دارد.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

REFERENCES

1.Kianmehr Z, Soleimanjahi H, Ardestani SK, Fotouhi F, Abdoli A. Influence of Brucella abortus lipopolysaccharide as an adjuvant on the immunogenicity of HPV-16 L1VLP vaccine in mice. Medical Microbiology and Immunology 2015; 204(2): 205-13.

2.Castañeda–Iñiguez M, Toledo-Cisneros R, Aguilera-Delgadillo M. Risk factors for cervico-uterine cancer in women in Zacatecas. Salud Publica de Mexico 1998; 40(4): 330-8.

3.Berman TA, Schiller JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: one cause, two diseases. Cancer 2017; 123(12): 2219-29.

4.Javanmard D, Namaei MH, Haghighi F, Ziaee M, Behravan M, Mirzaei J, et al. The frequency and typing of human Papilloma virus among women with normal and abnormal cytology in Southern Khorasan, Eastern Iran. Jundishapur J Microbiol 2017; 10(4): e43213.

5.Karani LW, Musyoki S, Orina R, Nyamache AK, Khayeka-Wandabwa C, Nyagaka B. Human papillomavirus genotype profiles and cytological grades interlinkages in coinfection with HIV. The Pan African Medical Journal 2020; 35(67):

6.Fakhraei F, Haghshenas MR. Human papillomaviruses and cancer. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2013; 23(98): 340-60.

7.Thomas M, Narayan N, Pim D, Tomaić V, Massimi P, Nagasaka K, et al. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. Oncogene 2008; 27(55): 7018-30.

8.Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings .Journal of Infectious Diseases 2010; 202(12): 1789-99.

9.Mortazavi S, Zali M, Raoufi M, Nadji M, Kowsarian P, Nowroozi A. The prevalence of human papillomavirus in cervical cancer in Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2002; 3(1): 69-72.

10.Eghbali SS, Amirinejad R, Obeidi N, Mosadeghzadeh S, Vahdat K, Azizi F, et al. Oncogenic human papillomavirus genital infection in southern Iranian women: population-based study versus clinic-based data. Virology Journal 2012; 9(1): 194.

11.Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries: a review article. Iranian Journal of Public Health 2018; 47(3): 309.

12.Qi F, Xu Q, Huang Y. Rapid detection and typing of human papillomavirus in tumor tissue by reverse dot blot technique. Progress in Biochemistry and Biophysics 1998; 25(1): 75-8.

13.Ghaffari SR, Sabokbar T, Mollahajian H, Dastan J, Ramezanzadeh F, Ensani F, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women with normal and abnormal cervical cytology in Iran. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2006; 7(4): 529-32.

14.Esmaeili M, Bonyadi M, Dastranj A, Alizadeh M, Melli MS, Shobeiri MJ. HPV typing in women with cervical precancerous and cancerous lesions in northwestern Iran. Gynecologic and Obstetric Investigation 2008; 66(1): 68-72.

15.Allameh T, Moghim S, Asadi-Zeidabadi M. A survey on the prevalence of high-risk subtypes of human papilloma virus among women with cervical neoplasia in Isfahan university of medical science. Archives of Gynecology and Obstetrics 2011; 284(6): 1509-13.

16.Farjadian S, Asadi E, Doroudchi M, Dehaghani AS, Tabei S, Kumar V, et al. High risk HPV types in southern Iranian patients with cervical cancer. Pathology Oncology Research 2003; 9(2): 121-5.

17.Kimyaiee P, Morvarian S, Mirzamoradi M, Khodabandelouie S, Bakhtiyari M. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cervical cancer specimens in Tehran. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2015; 25(123): 185-90.

18.Khorasanizadeh F, Hassanloo J, Khaksar N, Taheri SM, Marzaban M, Rashidi BH, et al. Epidemiology of cervical cancer and human papilloma virus infection among Iranian women-Analyses of national data and systematic review of the literature. Gynecologic Oncology 2013; 128(2): 277-81.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

19.Khodakarami N, Clifford GM, Yavari P, Farzaneh F, Salehpour S, Broutet N, et al. Human papillomavirus infection in women with and without cervical cancer in Tehran, Iran. International Journal of Cancer 2012; 131(2): E156-E61.

20.Sadeghi A, Sobhani A ,Etaati Z, Jahanlou A, Shiroudi M. Prevalence of human papilloma virus among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from 2001 to 2006 in Bandarabas. Iranian Journal of Pathology (IJP)2008; 3(4), 183-5

21.Niakan M, Yarandi F, Entezar M. Human papillomavirus (HPV) detection in biopsies from cervical cancer patients; A population–based study from Iran. Iranian Journal of Clinical Infectious diseases JAN 2009; 4(1): 35-7.

22.Mehran SMM, Ghanaei MM, Mojtehadi A. The prevalence of human papilloma virus (HPV) in women using liquid base pap smear in Rasht, Northern of Iran. Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR 2015; 9(7): IC01.

33.Hamidi-Fard M, Fattahi-Abdizadeh M, Makvandi M, Ranjbari N, Mansoori E, Samarbaf-Zadeh A. Detection and genotyping of human papillomavirus in cervical tissue samples in Ahvaz, Southwest Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 2013; 6(7): 1B.

24.Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. Jama 2007; 297(8): 813-9.

25.Sun P, Song Y, Ruan G, Mao X, Kang Y, Dong B, et al. Clinical validation of the PCR-reverse dot blot human papillomavirus genotyping test in cervical lesions from Chinese women in the Fujian province: a hospital-based population study. Journal of Gynecologic Oncology 2017; 28(5):e50

36.Jalilvand S, Shoja Z, Nourijelyani K, Tohidi HR, Hamkar R. Meta-analysis of type-specific human papillomavirus prevalence in Iranian women with normal cytology, precancerous cervical lesions and invasive cervical cancer: Implications for screening and vaccination. Journal of Medical Virology 2015; 87(2): 287-95.

27.Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. International Journal of Cancer 2012; 131(10): 2349-59.

28.Shafaghi B, Jarollahi A, Yousefzadeh B, Ameri A, Moghadam S, Mostafavi M. Human papilloma virus prevalence and types among Iranian women attending regular gynecological visits. Reports of Radiotherapy and Oncology 2013; 1(2): 73-9.

29.Castellsagué X, Menéndez C, Loscertales MP, Kornegay JR, dos Santos F, Gómez-Olivé FX, et al. Human papillomavirus genotypes in rural Mozambique. The Lancet 2001; 358(9291): 1429-30.

30.Delgado D, Marín JM, de Diego J, Guerra S, González B, Barrios JL, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in women with abnormal cervical cytology in the Basque Country, Spain. Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica 2012; 30(5): 230-5.

31.Herrero R, Hildesheim A, Bratti C ,Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. Journal of the National Cancer Institute 2000; 92(6): 464-74.

32.Broccolo F, Chiari S, Piana A, Castiglia P ,Dell'Anna T, Garcia-Parra R, et al. Prevalence and viral load of oncogenic human papillomavirus types associated with cervical carcinoma in a population of North Italy. Journal of Medical Virology 2009; 81(2): 278-87.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 8:16 +0330 on Wednesday October 27th 2021

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Prevalence of Human Papillomavirus in Women with Abnormal Pap smear Referred to Shahid Mofatteh Clinic by Multiplex PCR & Reverse Dot Blot Hybridization in Yasuj, Iran

Ghaffari P[1*], Jansar R[2], Zol-Adl M[3], Ghadami R[4]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [2]Departments of Pathology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [3]Departments of Psychiatry, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [4]Student Research Committees, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 02 Jan 2020 Accepted: 11 Aug 2021

Abstract:

Background & aim: Human papillomavirus is the most common sexually transmitted disease and the main risk factor for malignant and malignant lesions in the cervix. The aim of the present study was to determine and evaluate the prevalence of human papillomavirus in women with abnormal pap smear referred to Shahid Mofatteh specialized clinic by Multiplex PCR & Reverse Dot Blot Hybridization in Yasuj, Iran.

Methods: The present descriptive-analytical study was conducted during the years 2015-2016. A total of 67 abnormal cervical cytology specimens including 51 ASC-US specimens, 9 LSIL specimens and 7 HSIL specimens were collected and analyzed by Multiplex PCR & Reverse Dot Blot Hybridization. The collected data were analyzed using chi-square test

Result: The overall prevalence of human papillomavirus (HPV) was 61.2%. 36 (87.8%) women were infected with high-risk types of human papillomavirus, 26 (63.4%) with low-risk types and 2 (4.9%) with unknown types. The most common high-risk types were HPV 39 (43.9%), HPV66 (31.7%), HPV31 (26.8%) and HPV18 (14.6%), respectively. HPV16 was detected in only 2 samples (4.9%).

Conclusion: The results of the present study indicated a high prevalence of papillomavirus infection in women with abnormal Pap smear. In addition, different high-risk genotypes of this virus were identified compared to other studies in Iran. Further samples from wider geographical areas are needed to study the molecular epidemiology and genotypes of human papillomavirus.

Keyword: Human Papillomavirus, High Risk Type, Abnormal Pap smear, PCR

***Corresponding author: Ghaffari P,** Department of Obstetrics and Gynecology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email:pari.ghaffari@gmail.com

Please cite this article as follows:
Ghaffari P, Jansar R, Zol-Adl M, Ghadami R. Prevalence of Human Papillomavirus in Women with Abnormal Pap smear Referred to Shahid Mofatteh Clinic by Multiplex PCR & Reverse Dot Blot Hybridization in Yasuj, Iran. Armaghane-danesh 2021; 26(3): 417-428.