بررسی ویروس پاپیلومای انسانی در زگیل‌های آنوژنیتال با روش PCR

دکتر سهیلا نصیری[1]، دکتر فریبا قلمکارپور[1]، دکتر آسیه صابری[2]، دکتر پروانه وصال[3]

۱ـ استادیار، مرکز تحقیقات پوست، ۲ـ دستیار پوست، ۳ـ دانشیار، گروه آسیب‌شناسی؛ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

زمینه و هدف: زگیل آنوژنیتال بیماری نسبتاً شایعی است و سالانه ۱/۳ میلیون مورد جدید در امریکا تشخیص داده می‌شود. این بیماری در ۱٪ افراد بالغ فعال از نظر جنسی دیده می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی زگیل‌های آنوژنیتال از نظر ویروس پاپیلومای انسانی به روش PCR، در مرکز تحقیقات پوست دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفت.

روش اجرا: این مطالعه مقطعی، روی ۳۲ بیمار مبتلا به زگیل آنوژنیتال که با بررسی آسیب‌شناسی، بیماری آنان تایید شده بود صورت گرفت. نمونه بیوپسی از ضایعه‌های آنوژنیتال این بیماری از نظر وجود ویروس پاپیلومای انسانی و نیز تعیین تیپ ویروس مزبور با روش PCR، بررسی شد.

یافته‌ها: در ۱۲ بیمار (۳۷٪) ویروس پاپیلومای انسانی با روش PCR شناسایی شد. هم چنین توزیع بیماران از نظر ابتلا به ویروس پاپیلومای انسانی در دو گروه پرخطر یا کم خطر تفاوتی نداشت. بین تظاهرات بالینی و تیپ پاپیلوما ویروس ارتباطی وجود نداشت.

نتیجه گیری: تکرار این مطالعه با تعداد نمونه بیش‌تر و شرایط کنترل شده توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: زگیل آنوژنیتال، ویروس پاپیلومای انسانی، Polymerase Chain Reaction (PCR)

وصول مقاله: ۸۴/۱/۳۰ پذیرش: ۸۴/۳/۵ *فصلنامه بیماری‌های پوست ۱۳۸۵؛دوره ۹ (۱) : ۲۲-۲۷*

مقدمه

زگیل، تزاید خوش خیم سلول‌های پوست و مخاط است که در نتیجه عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی ایجاد می‌شود. این ویروس آهسته رشد می‌کند و می‌تواند برای مدت‌های طولانی به صورت ساب کلینیکی باقی بماند. زگیل ناحیه آنوژنیتال (کوندیلوما) یک بیماری منتقله از راه تماس جنسی است که هر دو جنس را درگیر می‌کند و در حال حاضر به ویژه در زنان جوان به یک مشکل بالینی جدی تبدیل شده است(۱).

کوندیلوما، بیماری نسبتاً شایعی است و سالانه ۱/۳ میلیون مورد جدید در امریکا تشخیص داده می‌شود(۲). این بیماری در ۱٪ افراد بالغ فعال از نظر جنسی دیده می‌شود و در ۲٪ موارد نیز زگیل ناحیه تناسلی با استفاده از اسید استیک، قابل مشاهده است. در ۲۰ تا ۵۰ درصد افراد جامعه نیز DNA ویروس پاپیلومای انسانی در دستگاه تناسلی قابل شناسایی است(۳).

بیش از ۷۰ نوع ویروس پاپیلومای انسانی، شناخته شده است و از مهم‌ترین انواع آن که در ایجاد زگیل آنوژنیتال در هر دو جنس نقش دارند می‌توان به تیپ‌های ۶، ۱۱، ۱۶،۱۸، ۳۱، ۳۳ اشاره کرد. تیپ‌های ۶ و ۱۱ از نظر تبدیل به بدخیمی موجب ایجاد زگیل‌های کم خطر می‌شوند ودر مقابل تیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳ توانایی بالقوه‌ای برای تبدیل به بدخیمی دارند و در گروه پرخطر

مؤلف مسوول: دکتر سهیلا نصیری ـ تهران، بیمارستان شهداء تجریش، مرکز تحقیقات پوست

پست الکترونیک: dermsrc@yahoo.com

(High risk) طبقه بندی می‌شوند(۵ و ۴).

شایع‌ترین تیپ‌های ویروس پاپیلومای انسانی دخیل در ایجاد کوندیلوما، تیپ ۶ و ۱۱ است ولی درگیری با تیپ‌های ۱۸، ۱۶ نیز دور از انتظار نیست(۷ و ۶).

عفونت ناشی از ویروس پاپیلومای انسانی به ناحیه آنوژنیتال محدود نیست و می‌تواند در زنان به دستگاه تناسلی فوقانی نیز گسترش یابد. هم چنین ضایعه‌های اطراف مقعدی در هر دو جنس می‌تواند درگیری کانال آنال را موجب شود. بیماری ناشی از تیپ‌های پر خطر (۱۶،۱۸، ۳۱، ۳۳) احتمال بدخیمی در نواحی فوقانی تناسلی (سرویکس) را در زنان افزایش می‌دهد(۱).

عفونت ناشی از پاپیلومای انسانی در سرویکس با پیدایش ضایعه‌های پیش بدخیم و بدخیم در این ناحیه دیده می‌شود(۱). با استفاده از PCR ، در نمونه‌های کارسینوم سرویکس و نیز کارسینوم ولو DNA ویروس شناسایی شده است به طوری که تیپ ۱۶ مهم‌ترین تیپ ویروسی در کارسینوم سرویکس و تیپ‌های ۶ و ۱۱ تیپ‌های اصلی در کارسینوم سرویکس وولو بوده‌اند(۸).

با استفاده از PCR، شیوع کلی DNA ویروس پاپیلومای انسانی در سرطان آلت برابر سرطان ولو بوده و حدود ۴۰٪ گزارش شده است(۹).

در حال حاضر به علت شیوع کم زگیل‌های ناشی از تیپ‌های بالقوه بدخیم (پرخطر) ویروس پاپیلومای انسانی، پی‌گیری مبتلایان از نظر بیماری بدخیم (کارسینوم سرویکس و سرطان آلت) توصیه نشده است ولی با توجه به جدی بودن بدخیمی‌های یاد شده، به نظر می‌رسد که پی‌گیری به دلیل فوق، منطقی باشد یا لااقل در صورت مواجهه با میزان بالای زگیل‌های آنوژنیتال ناشی از تیپ‌های پرخطر چنین اقدامی (پی‌گیری بیماران) الزامی دانسته شود.

در این تحقیق تمامی بیماران مبتلا به زگیل آنوژنیتال مراجعه کننده به درمانگاه‌های وابسته به مرکز تحقیقات پوست دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی از نظر وجود تیپ‌های ۶، ۱۱، ۱۶، ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی مورد بررسی قرار گرفتند.

روش اجرا

این مطالعه به روش مقطعی (Cross-sectional) صورت گرفت و طی آن همه‌ی بیماران مراجعه‌کننده به درمانگاه‌های مرکز تحقیقات پوست دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که از نظر بالینی مشکوک به زگیل ناحیه آنوژنیتال بوده و جهت ورود به تحقیق اعلام آمادگی نموده بودند مورد بررسی قرار گرفتند.

بعد از معاینه بالینی و ثبت اطلاعات مربوط، نمونه بیوپسی از ضایعه مشکوک به زگیل تهیه و قسمتی از آن به منظور بررسی آسیب‌شناسی به آزمایشگاه بیمارستان لقمان ارسال شد.

در مواردی که تشخیص زگیل در نمونه فوق تأیید می‌شد، قسمت دیگر نمونه برای بررسی حضور ویروس پاپیلومای انسانی و تعیین تیپ آن با استفاده از PCR به مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ارسال می‌شد. نمونه های بیوپسی شده تا زمان ارسال به آزمایشگاه به ترتیب در محیط‌های دارای فرمالین و نرمال سالین نگه‌داری می‌شدند. روش اجرای PCR به قرار زیر بود:

۱ـ استخراج DNA: هر نمونه به چند قسمت تقسیم شده با بافر مخصوص شست و شو می‌شد و سپس به کمک $MgCl_2$ ۵ mM و SDS ۱٪ ، Sucrose ۰/۳۲ M ، Tris ۱۰ mM می‌جوشید و سپس، DNA آن آزاد می‌شد. آنگاه مواد پروتئینی از DNA با فنل ـ کلروفرم جدا و DNA آزاد شده با الکل تغلیظ و رسوب داده می‌شد.

۲ـ طراحی پرایمرها: ژن L_2 ویروس HPV (تیپ‌های مختلف) از بانک ژن جست وجو شد و با نرم افزار

DNA sis، برای شناسایی ویروس پرایمر طراحی و سنتز شد.

۳ـ اجرای PCR: مقادیر مناسب DNA (نمونه مشکوک به آلودگی با ویروس)، dNTP، بافر مخصوص آنزیم پلیمراز، کلرور منیزیوم، آنزیم Taq DNA Polymerase، هر دو پرایمر reverse و forward در شرایط مطلوب در داخل لوله مخصوص PCR مخلوط شد و در دستگاه نرمال سایکلر قرار گرفت تا طبق برنامه زیر واکنش PCR انجام گیرد:

Predenaturation	5 minutes
Denaturation 94 C	30 seconds
Annealing 50-60 C	30 seconds
Extension 72 C	30 seconds
Post extension 72 C	5 minutes

۴ـ الکتروفورز محصول PCR: محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورز وبا اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد تا به کمک دستگاه UV transilluminator نوارهای DNA تکثیر و قابل رؤیت شود. شایان ذکر این که از ژل فوق عکس تهیه می شد.

داده‌ها بعد از جمع‌آوری با استفاده از آزمون Chi-square و با قبول مرز معنی‌داری روی P<۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

در این تحقیق ۳۲ بیمار (۱۷ مرد و ۱۵زن) مشکوک به ابتلا به زگیل ناحیه آنوژنیتال مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سن این بیماران ۸/۱± ۲۹/۵ سال (حداقل ۱۶ و حداکثر ۴۶ سال) بود. ۵ نفر از بیماران مجرد، ۲۵ نفر متأهل و ۲ نفر جدا شده بودند. میانگین مدت بیماری ۶±۶/۱ ماه (حداقل یک و حداکثر ۲۴ ماه) بود.

در ۱۳ بیمار، ضایعه مشابه در شریک جنسی هم وجود داشت. ۱۱ بیمار برای ضایعه مورد بررسی قبلاً با کرایو و ۲ بیمار با پودوفیلین درمان شده بودند.

ناحیه تناسلی در ۲۵ نفر و اطراف مقعد در ۴ نفر درگیر بود. در ۳ نفر، درگیری هر دو ناحیه وجود داشت. وسعت درگیری در ۱۱ نفر کم (ضایعه زیر ۱۰ عدد)، ۱۵ نفر متوسط (تعداد ۱۰ تا ۲۰ عدد) و در ۳ نفر شدید (تعداد ضایعه بیش از ۲۰ عدد) بود. از نظر بالینی ۲۰ نفر مبتلا به کوندیلوما آکومیناتا و ۱۲ نفر مبتلا به فلات کوندیلوما تشخیص داده شدند. هیچ یک از بیماران به بوونوئیدپاپولوزیس مبتلا نبودند. سابقه مصرف داروهای سرکوب‌کننده ایمنی در ۶ ماه گذشته در هیچ یک از بیماران وجود نداشت. در تمام موارد، یافته‌های آسیب‌شناسی منطبق با کویلوسیتوز با آتیپی خفیف بود و تشخیص بالینی ابتلا به ضایعه زگیلی با یافته‌های آسیب‌شناسی تایید شد.

در ۱۲ بیمار (۳۷٪) یافته‌های PCR مؤید وجود ویروس پاپیلومای انسانی در ضایعه‌ها بود. در ضایعه پوستی ۴ بیمار پاپیلوما ویروس تیپ ۶ و ۱۱ و در ۳ بیمار تیپ ۱۶ و ۱۸ به صورت توأم وجود داشت. در یک بیمار پاپیلوما ویروس تیپ ۱۱ و در ۴ بیمار نیز تنها ویروس تیپ ۱۸ شناسایی شد.

در جدول شماره ۱ توزیع بیماران مثبت از نظر پاپیلوما ویروس بر اساس نوع بالینی زگیل و نوع ویروس به دست آمده نشان داده شده است. با آزمون Chi-square مشخص شد که بین تظاهرات بالینی و تیپ پاپیلوما ویروس ارتباطی وجود ندارد(P=۰/۷۵).

از نظر محل درگیری، ناحیه تناسلی ۷ مورد با تیپ ۶ یا ۱۱ (ویروس‌های Low risk) و ۸ مورد با تیپ ۱۶ یا ۱۸ (ویروس‌های High risk) درگیری داشتند. در ناحیه مقعدی نیز با تیپ‌های ۶ یا ۱۱ و ۱۶ یا ۱۸ در هر کدام دو مورد درگیری دیده شد (P>۰/۰۵).

جدول شماره ۱ ـ توزیع مبتلایان به زگیل آنوژنیتال بر اساس نوع بالینی زگیل و تیپ ویروس پاپیلومای انسانی

تظاهر بالینی زگیل	نوع ویروس				جمع
	٦	١١	١٦	١٨	
آکومیناتا	۳	۳	۱	۴	۱۱
فلات	۱	۲	۲	۳	۸

بحث

در مطالعه حاضر ۳۲ بیمار مبتلا به زگیل ناحیه آنوژنیتال مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران ۲۹/۵ سال بود. توزیع سنی بیماران با سن حداکثر فعالیت جنسی مطابقت دارد که به نقش انتقال ویروس از راه تماس جنسی اشاره دارد که راه اصلی انتقال بیماری است(۲). با این حال ۵ نفر از مبتلایان مجرد بودند و بنا به اظهار خودشان سابقه تماس جنسی نداشتند. این مسأله بیان‌گر آن است که در بعضی از بیماران احتمال انتقال غیرجنسی را باید مد نظر داشت که در سایر منابع نیز به آن اشاره شده است(۱۰ و ۲).

در ۱۳ بیمار، ضایعه مشابه در شریک جنسی بیمار نیز وجود داشت بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که با در نظر گرفتن میزان عفونت زایی بالای زگیل آنوژنیتال از راه تماس جنسی، به بیماران توصیه شود تا زمان بهبود ضایعه‌ها یا به مدت ۶ تا ۱۲ ماه بعد از آن تماس جنسی نداشته باشند یا از کاندوم استفاده کنند(۲).

از نظر آناتومیک شایع‌ترین محل درگیری، ناحیه تناسلی (در ۲۸ بیمار) بود. از نظر بالینی، ۲۰ نفر مبتلا به کوندیلوما آکومیناتا و ۱۲ نفر مبتلا به فلات کوندیلوما تشخیص داده شدند. در بسیاری از پژوهش‌های قبلی نیز ناحیه تناسلی شایع‌ترین محل درگیری بود و از نظر بالینی نوع کوندیلوما آکومیناتا شایع‌تر بوده است(۱۱ و ۹).

از ۲۰ بیمار مبتلا به کوندیلوما آکومیناتا ۱۹ مورد درگیری تناسلی داشتند و در بیش‌تر بیماران تعداد ضایعه‌ها متعدد بود. در مطالعه Skerlev در سال ۲۰۰۲ اکثر موارد کوندیلوما آکومیناتا، روی سطوح مخاطی تناسلی گزارش شد و ضایعه‌ها عمدتاً چند کانونی و تعداد آن‌ها از ۵ تا ۱۵ عدد متغیر بود(۹).

در تمام نمونه‌های بیوپسی شده، یافته‌های آسیب‌شناسی نشان دهنده‌ی کویلوسیتوز با آتیپی خفیف بود. در واقع تظاهر آسیب‌شناسی ضایعه‌های مختلف در معاینه بالینی، مشابه بود. این نتیجه در مطالعه‌های قبلی نیز حاصل شده بود(۱۲ و ۱). بر این اساس، به نظر می‌رسد میکروسکوپ نوری در طبقه‌بندی ضایعه‌ها دارای نقش محدودی باشد.

در ۱۲ بیمار (۳۷٪) DNA ویروس در ضایعه‌ها به روش PCR شناسایی شد. در مطالعه دیگری که روی ۱۷۱ مرد با زگیل تناسلی، برای شناسایی تیپ‌های ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی به روش PCR و RFLP (Restriction fragment length polymorphism) صورت گرفت، ۸۰٪ نمونه‌ها از نظر وجود ویروس پاپیلومای انسانی مثبت بودند(۱۳).

در مطالعه‌ای که توسط Syrjanen و همکارانش در سال ۱۹۸۷ صورت پذیرفت، ۴۴/۴٪ نمونه‌های زگیل آنوژنیتال حاوی ویروس پاپیلومای انسانی بودند. هم چنین در مطالعه Handley در سال ۱۹۹۲، ۵۳/۳٪ نمونه‌ها از نظر وجود ویروس پاپیلومای انسانی مثبت بود(۱۴)، که علت پایین بودن این رقم در حساسیت نسبتاً پایین تکنیک In situ hybridization (روش مورد استفاده مطالعه آنان) بیان شد. در مطالعه ما که از تکنیک بسیار حساس و اختصاصی مولکولی PCR استفاده شد شاید بتوان علت

این درصد پایین را خطای آزمایشگاهی در طی مراحل کار در آزمایشگاه دانست.

در ۵ بیمار (۴۱/۶٪) تیپ ۶ یا ۱۱ (ویروس‌های کم خطر از نظر تبدیل به بدخیمی) و در ۷ بیمار (۵۸/۳٪) تیپ ۱۶ یا ۱۸ (ویروس‌های پرخطر از نظر تبدیل به بدخیمی) شناسایی شد.

در مطالعه‌های قبلی در اکثر نمونه‌های بیوپسی زگیل آنوژنیتال، ویروس‌های کم خطر با درصد بسیار بالاتری نسبت به تیپ های ۱۶ و ۱۸ گزارش شده بودند(۱۶-۱۴ و۸ و ۱). هم چنین در مطالعه Skerlev و همکارانش که در سال ۲۰۰۲ در زاگرب به اجرا درآمد(۱۲) ویروس‌های تیپ ۶ یا ۱۱ در ۷۹٪ نمونه‌ها و تیپ ۱۶ یا ۱۸ در ۲۱٪ نمونه‌ها شناسایی شد. درمطالعه Grce نیز ۸۰٪ ویروس‌های شناسایی شده از نوع کم خطر بودند. ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ در ۴/۶٪ و تیپ ۱۸ فقط در ۱/۷٪ از نمونه‌ها وجود داشت(۱۴).

با توجه به یافته‌های این مطالعه که مغایرت آشکاری با سایر پژوهش‌ها دارد، به نظر می‌رسد تکرار تحقیق با تعداد نمونه بیش‌تر و شرایط کنترل شده‌تری ضروری باشد.

تقدیر و تشکر

به این وسیله از زحمات جناب آقای دکتر بهرام کاظمی و کارکنان محترم مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر آزمایش‌های PCR تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1-Syrajanen SM, Von Kroch G. Detection of human papilloma virus DNA in anogenital condylomata in men using in situ DNA hybridization applied to paraffin sections. Genitourin Med 1987; 63: 32-90.

2-Sterling JC, Kurtz JB. Viral infections. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM, editors. Rook's textbook of dermatology. 6th ed. Oxford: Blakwell Science; 1998: p.1037-48.

3-Androphy EJ, Beutner K, Olbricht S. Human papilloma virus infection. In: Arndt KA, LeBoit PE, Robinson JK, Wintroub BU, editors. Cutaneous medicine and surgery. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company;1996; p.1106-11.

4-De Marco F, Di Carto A. Detection of HPV in genital conylomata: Correlation between viral load and clinical outcome. J Exp Clin Cancer Res 2001; 20: 377-83.

5-Brown DR, Schoreder JM, Bryan JT. Detection of multiple human papilloma virus types in condyloma acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. J Clin Microbiol 1999; 37: 3316-22.

6-Odom RB, James WD, Berger TG, editors. Andrews diseases of the skin. 9th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000: p.514-17.

7-Czegledy J, Gergely L. Detection of human papilloma virus deoxyribonucleic acid in the female genital tract. Med Microbiol Immunol 1989; 178: 309-14.

8-Wang J, Liu Y, Jin H. Clinical and experimental studies on condyloma acuminata. Zhhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 2000; 22: 487-90.

9-Skerlev M, Grce M. Human papilloma virus male genital infections: Clinical variations and the significance of DNA typing. Clin Dermatol 2002; 20: 173-78.

10-Czegledy J. Sexual and non-sexual transmission of human papilloma virus. Acta Microbiol Immunol Hung 2001; 48: 511-17.

11-Syrjanen SM, Von Krogh G. Anal condylomas in men. 1. Histopathological and virological assessment. Genitourin Med 1989; 65: 216-24.

12-Gross G, Ikenberg H. Papilloma virus infection of the anogenital region: correlation between histology, clinical picture, and virus type proposal of a new nomenclature. J Invest Dermatol 1985; 85: 147-52.

13-Grce M, Husnjak K, Skerlev M. Detection and typing of human papilloma virus by means of polymerase chain reaction and fragment length polymerase chain reaction and fragment length polymorphism of male genital lesions. Anticancer Res. 2000; 20: 2097-102.

14-Handley JM. Human papilloma virus DNA detection in primary anogenital warts and cervical low-grade intraepithelial neoplasias in adults by in situ hybridization. Sexually Transmitted Diseases 1992; 225-29