

فراوانی ویروس SEN در سرویسیت و تومورهای گردن رحم در اصفهان

محمد بهابادی نژاد^۱، دکتر مجید بوذری^۲، دکتر اردشیر طالبی^۳

خلاصه

مقدمه: ویروس SEN (SEN Virus یا SEN-V) از خانواده‌ی آنلوویریده است. به طور عمده توسط خون منتقل می‌شود و ارتباط آن با بیماری‌های مختلف در حال بررسی است. شیوع SEN-V در افراد سالم شامل اهداکنندگان خون، به طور واضح در مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت است. ضایعات دستگاه تناسلی زنان طیفی از عفونت‌های خفیف و بدون علامت مثل سرویسیت مزمن تا سرطان‌های مختلف هستند. با توجه به این که یکی از عوامل اتیولوژیک سرطان‌ها ویروس‌ها هستند و همچنین وجود همزمان SEN-V با پاتوژن‌های دیگر و انتقال عمودی ویروس، در این مطالعه ارتباط این ویروس با سرویسیت و سرطان سرویکس مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه فراوانی سوش‌های H و D وی SEN-V، در ۱۱۷ نمونه‌ی بیوپسی سرویکس و رحم ثابت شده در فرمالین و پارافینه با Nested PCR بررسی شدند. دو محصول PCR (Polymerase chain reaction) پس از تعیین توالی با توالی‌های بانک ژن مقایسه شدند. آزمون دقیق فیشر برای مقایسه‌ی آماری داده‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها: تشابه زیادی بین توالی با سوش‌های D و H مشاهده شد. در ۴۵ نمونه‌ی سرطانی ۱ مورد سوبه‌ی H، ۱ مورد سوبه‌ی D و یک مورد آلوده به هر دو سوبه بود. در ۷۲ نمونه‌ی سرویسیت به ترتیب ۱۳ و ۹ مورد آلوده به سوبه‌های D و H بودند. در مقایسه با نمونه‌های سرطانی آلودگی در نمونه‌های سرویسیت مزمن به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج ممکن است نشانگر احتمال ارتباط این ویروس به خصوص با سرویسیت مزمن با علل ناشناخته باشد که اثبات آن به مطالعات بیشتر نیاز دارد.

واژگان کلیدی: ویروس SEN، سرطان رحم، واکنش زنجیره‌ی پلیمرز، سرویسیت.

مقدمه

شیوع آن‌ها با هم متفاوت است (۳). سوش D و سوش H نسبت به بقیه‌ی سوش‌ها فراوانی بیشتری دارند (۴). عفونت خونی با SEN-V به طور معمول خود به خود محدود شده، عفونت مجدد با سوش مشابه می‌تواند اتفاق بیفتد. میزان شیوع SEN-V در افراد سالم شامل اهدا کنندگان خون، به طور واضح در مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت است (۵). در ایران در سال ۲۰۰۷ در جمعیت اهدا کنندگان خون سالم در تهران شیوع این ویروس ۲۳ درصد گزارش شده است (۶). در حالی که در سال ۲۰۰۸ در استان گیلان فراوانی قابل توجه ۹۸

ویروس SEN (SEN Virus یا SEN-V) یک ویروس قابل انتقال از راه خون است که در سال ۱۹۹۹ در ایتالیا و در حین بررسی علت هپاتیت‌های ویروسی با منشأ نامعلوم کشف شد و ارتباط آن با بیماری‌های کبدی، ایدز در حال بررسی است. این ویروس بدون غشا بوده، دارای DNA تک رشته و حدود ۳۸۰۰ نوکلئوتید است (۱) که به جنس شناور آنلوویروس تعلق دارد (۲). ویروس دارای ۹ سوش است که از A تا I نام‌گذاری شده‌اند و در جمعیت‌های مختلف میزان

^۱ کارشناس ارشد، بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ دانشیار، بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳ دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

شد و از نظر تغییرات هیستوپاتولوژی در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد از هر نمونه برش های ۲۰ میکرومتری تهیه و در تیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شدند.

روش استخراج DNA از بلوک‌های پارافینی:

در این مرحله ابتدا بافت ها در ۱ میلی لیتر گزلیل قرار داده شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد در ترمومیکس انکوبه گردید. پس از آن نمونه‌ها در دور $11337 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول‌های رویی دور ریخته شدند. این مرحله سه بار تکرار گردید. در مراحل بعدی برای حذف گزلیل از محیط از اتانول ۹۹/۹۹ درصد استفاده شد؛ به این صورت که پس از اضافه کردن اتانول، تیوب‌ها به مدت کوتاهی ورتکس و به مدت ۱۰ دقیقه در دور $9660 \times g$ سانتریفیوژ گردید و محلول‌های رویی دور ریخته شدند. این مرحله سه بار تکرار گردید. نمونه ها به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه هوادهی شدند (در حالی که درب لوله‌ها باز گذاشته شده بود).

پس از پارافین زدایی از بافت‌ها مرحله‌ی آخر پارافین زدایی با استفاده از اتانول ۹۰ درصد و در دور بعد با استفاده از اتانول ۷۰ درصد تکرار گردید. پس از دور ریختن محلول‌های رویی درب تیوب‌ها باز گذاشته شدند تا محلول باقی مانده در بافت‌ها تبخیر شود. ۲۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۵ مولار ($pH = 8$) و ۵۰ میکرولیتر NaCl، ۵ مولار به هر لوله اضافه و به مدت ۱ دقیقه ورتکس گردید. سپس ۶۵۰ میکرولیتر بافر لیز کننده به هر لوله اضافه و به مدت ۱ دقیقه ورتکس گردید. پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ترمومیکسر با دمای ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد و

درصد در بیماران تالاسمی و ۹۰/۸ درصد در افراد سالم گزارش شده است (۷).

ضایعات دستگاه تناسلی زنان طیفی از عفونت‌های خفیف و بدون علامت مثل سرویسیت مزمن تا سرطان‌های مختلف را در بر می‌گیرند (۸). سرطان‌های رحم در زنان بسیار شایع هستند و آمار بالای مرگ و میر ناشی از آن‌ها به خصوص در کشورهای در حال توسعه چشمگیر است (۹). با توجه به این که یکی از عوامل اتیولوژیک سرطان‌ها ویروس‌ها هستند، همچنین وجود همزمان ویروس SEN-V با پاتوژن‌های دیگر (۱۰-۱۱) و اثبات انتقال عمودی این ویروس از طریق مادر به فرزند (۱۲، ۵)؛ هدف از این تحقیق، بررسی وجود این ویروس در بافت‌هایی مثل رحم یا دهانه‌ی رحم که ممکن است نشانه‌ی ارتباط آن با بیماری‌های دستگاه تناسلی زنان باشد، بود.

روش‌ها

در این تحقیق ۱۱۷ نمونه‌ی بیوپسی ثابت شده در فرمالین و پارافینه شده‌ی مربوط به بیماران مبتلا به سرطان رحم و سرویسیت از بایگانی بخش پاتولوژی بیمارستان الزهرا (س) در اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد ۷۲ مورد (۶۱/۵۳ درصد) مبتلا به سرویسیت مزمن و ۴۵ مورد (۳۸/۴۶ درصد) مبتلا به یکی از انواع بدخیمی بودند. نمونه‌های توموری از سال‌های ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۶ و نمونه‌های سرویسیت از سال ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ در بایگانی جمع‌آوری شده بودند.

برش و آماده سازی بافت‌ها:

ابتدا برش‌های ۳ میکرومتری تهیه شده از بلوک‌های پارافینی با روش هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی

شد. برای تعیین خلوص DNA از اسپکتروفوتومتری استفاده گردید. جذب DNA استخراج شده در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شد و نسبت OD260/OD280 به دست آمد. نسبت ۱/۸ به عنوان معیار برای کافی و مناسب بودن استخراج DNA در نظر گرفته شد. همچنین جهت تأیید استخراج DNA، از پرایمرهای (D-141F: 5-ACCACGGAGCAAAGAACAGA-3) و (D-141R: 5-GTCCTCCCGGCCTAGTCTTA-3) مربوط به ژن GJB2 که روی بازوی بلند کروموزوم ۱۳ انسانی قرار دارد، استفاده شد و برای انجام واکنش زنجیره‌ی پلیمرز (Polymerase chain reaction یا PCR) به عنوان House keeping gene استفاده شد (۱۳).

در این تحقیق از سه جفت پرایمر به نام‌های AI-1F، AI-1R، D-1148F، D-1341R، H-1020F و H-1138R استفاده شد. جفت پرایمر AI-1R/AI-1F در مرحله‌ی اول PCR و برای تکثیر یک قطعه ۳۴۹ نوکلئوتیدی استفاده شدند. پرایمرهای D-1148F/D-1341R و پرایمرهای H-1138R/H-1020F قطعه‌ای را در داخل قطعه‌ای که پرایمرهای اولی ایجاد کرده‌اند، تکثیر می‌کنند. در مرحله‌ی دوم برای شناسایی سوش D از جفت پرایمر D-1341R/D-1148F و برای شناسایی سوش H از جفت پرایمر H-1138R/H-1020F استفاده شد. توالی این پرایمرها در جدول ۱ آمده است (۳).

تکثیر DNA ویروس در مرحله‌ی اول در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مقادیر واکنش PCR شامل ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۱ واحد از آنزیم Smar taq DNA polymerase (سینا ژن، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۲۴۰ میکرومول از هر یک از dNTPها، ۲۰ میکرومول از Tris، ۵۰ میکرومول از KCl و ۲ میکرومول از MgCl₂ بود.

دور ۴۵۰ قرار داده شد. ۹۰ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر لوله اضافه و به مدت ۲ دقیقه ورتکس گردید. در مرحله‌ی بعد لوله‌ها به مدت یک ساعت در دستگاه ترمومیکسر در دمای ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور ۵۰۰ قرار داده شدند. این مرحله دو بار تکرار گردید. پس از خارج کردن نمونه‌ها از دستگاه ترمومیکسر برای غیر فعال کردن آنزیم لوله‌ها به مدت ۷-۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند.

در صورت مشاهده‌ی ذرات بافتی ابتدا لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۷۴۴۰ x سانتریفوژ گردید و سپس مایع رویی به نسبت ۱ به ۱ به لوله‌های جدید منتقل شد. به هر لوله به مقدار یک دهم حجم نمونه‌ی درون لوله استات سدیم (pH = ۵/۲) اضافه و به مدت ۱ دقیقه ورتکس گردید. به هر لوله به مقدار ۲ تا ۲/۵ برابر حجم نمونه، اتانول سرد شده اضافه و به آرامی با دست تکان داده شد. لوله‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد درون فریزر قرار داده شدند. بعد از خروج از فریزر لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۶۱۴۹ x سانتریفوژ گردید. مایع رویی از لوله‌ها خارج گردید. نمونه‌ها با ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شدند (به مدت ۶ دقیقه در دور ۶۱۴۹ x سانتریفوژ گردید). مایع رویی خارج گردید و لوله‌ها به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه هواده‌ی شدند و به هر لوله ۵۰ میکرولیتر TE اضافه گردید.

تأیید استخراج و کیفیت DNA استخراج شده از بافت:

برای تأیید استخراج DNA از بافت مقدار ۵ میکرولیتر از محلول استخراج شده با استفاده از ژل آگارز، الکتروفورز

سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۶ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و یک دوره طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

لازم به ذکر است در هر دو مرحله از نمونه‌ی شاهد منفی و نمونه‌ی شاهد مثبت که در مطالعه‌ی قبلی توسط کرمی راسه کناری و بوذری (۷) تهیه و تعیین توالی شده بود، استفاده شد.

برای بررسی محصول PCR از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. برای این کار، ابتدا آگارز به محلول ۰/۵ X TBE اضافه گردید. سپس با حرارت دادن ملایم در اجاق مایکروویو به طوری که زیاد نجوشد، آگارز حل گردید و سپس به ازای هر ۲۰ سی‌سی ژل آگارز یک میکرولیتر اتیدیوم بروماید اضافه شد و پس از به هم زدن آن، محلول درون ظرف جای ژل ریخته شد تا خنک و بسته شود. برای لود کردن (ریختن) نمونه‌های مورد نظر بر روی ژل از یک محلول رنگی متشکل از زایلین سیانول و بروموفنل بلو استفاده گردید. ولتاژ لازم برای الکتروفورز به تجربه برای هر سانتی متر طول ژل ۱۰ ولت در نظر گرفته شد.

برنامه‌ی PCR شامل یک دوره دناتور شدن در ۹۴ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۴ دوره تکثیر شامل دوره‌های دناتور شدن، الحاق و طویل شدن به ترتیب در ۹۴ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۶ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و یک دوره طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. محصول این مرحله به عنوان الگو برای PCR مرحله‌ی دوم استفاده شد.

تکثیر DNA ویروس در مرحله‌ی دوم برای هر دو سوش در حجم ۲۵ میکرولیتر ولی با پرایمرهای اختصاصی سوش انجام شد. مقادیر واکنش PCR شامل ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۱ واحد از آنزیم Smar taq DNA polymerase (سینا ژن، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۲۴۰ میکرومول از هر یک از dNTPها، ۲۰ میکرومول از Tris، ۵۰ میکرومول از KCl و ۲ میکرومول از MgCl₂ بود. برنامه‌ی PCR شامل یک دوره دناتور شدن در ۹۴ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۲۵ دوره تکثیر شامل دوره‌های دناتور شدن، الحاق و طویل شدن به ترتیب در ۹۴ درجه‌ی

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده برای شناسایی سوش‌های H و D

Nt	منطقه تکثیر	سوش	توالی پرایمر	پرایمر	مرحله‌ی PCR
۳۴۹	۱۳۷۷-۱۰۲۸	D	(5-TWCYCAACGACCAGCTAGACCT-3)	AI-1F	اول
۳۴۹	۱۳۳۶-۹۸۷	H	(5-GTTTGTGGTGAGCAGAACGGA-3)	AI-1R	
۱۹۳	۱۳۴۱-۱۱۴۸	D	(5-CTAAGCAGCCCTAACACTCATCCAG-3)	D-1148F	دوم
			(5-GCAGTTGACCGCAAAGTTACAAGAG-3)	D-1341R	
۱۱۸	۱۱۳۸-۱۰۲۰	H	(5-TTTGGCTGCACCTTCTGGTT-3)	H-1020F	دوم
			(5-AGAAATGATGGGTGAGTGTTAGGG-3)	H-1138R	

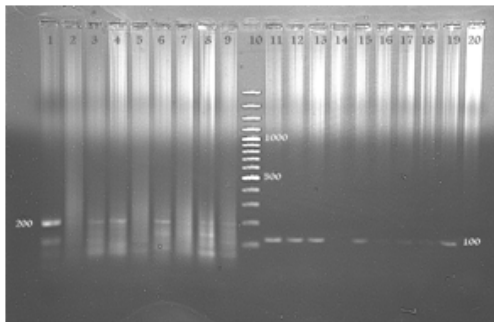
W: A or T, Y: C or T, M: A or C, K: G or T, S: C or G.

استخراج DNA از ژل آگارز

برای استخراج DNA از ژل آگارز از کیت استخراج DNA، DNA Extraction Kit K0513، Fermentas (Germany) استفاده شد. جهت تأیید وجود DNA ویروس SEN در نمونه‌های مورد آزمایش، قطعه‌ی تکثیر شده به وسیله‌ی PCR، توسط شرکت ژن فن‌آوران تعیین توالی شد و توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با توالی‌های موجود در NCBI با استفاده از موتور جستجوی WU-BLAST مقایسه گردید. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون دقیق فیشر با استفاده از نرم‌افزار GraphPad InStat نسخه ۳/۰۵ (Software, Sandiego, USA) برای مقایسه‌ی فراوانی‌ها استفاده شد.

الکتروفورز محصولات PCR

برای بررسی محصولات PCR از ژل الکتروفورز استفاده شد. در نتیجه باندهای حدود ۱۰۰ جفت بازی برای سوش H و باندهای حدود ۲۰۰ جفت بازی برای سوش D مشاهده و شاهد مثبت و شاهد منفی در هر دو مرحله‌ی PCR و همچنین در ژل الکتروفورز استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱. ژل الکتروفورز محصولات PCR سوش‌های H و D.

ستون شماره‌ی ۱ شاهد مثبت سوش D است و نمونه‌های مثبت این سوش در ستون‌های ۳، ۴، ۶، ۸ و ۹ و نمونه‌ی منفی در ستون ۵ مشاهده می‌شوند. ستون ۱۱ شاهد مثبت سوش H و شماره‌های ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۱۹ مربوط به نمونه‌های مثبت این سوش و ستون ۱۴ نمونه‌ی منفی هستند. ستون ۲۰ شاهد منفی است که از آب مقطر تزریقی به عنوان معادل DNA الگو استفاده شده است. ستون ۱۰ مارکر DNA است.

پردازش توالی دریافتی به کمک نرم‌افزارهای

Finch TV و Chromas

به کمک نرم‌افزارهای Finch TV و Chromas توالی‌های دریافتی اصلاح شده و نتایج اصلاحات انجام شده روی توالی‌ها در جدول ۳ آمده است.

در نتیجه‌ی اصلاح توالی‌ها، یک قطعه به طول ۹۴ باز مربوط به رشته‌ی ریورس سوش H به دست آمد که توالی آن با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و بررسی شد. در مورد سوش D طول قطعه‌ی حاصل ۱۹۴ باز و مربوط به رشته‌ی ریورس این سوش بود.

یافته‌ها

در مجموع تعداد ۱۱۷ نمونه توسط آسیب شناس بالینی مورد مطالعه قرار گرفت که از این تعداد ۷۲ مورد (۶۱/۵۳ درصد) مبتلا به سرویسیت مزمن و ۴۵ مورد (۳۸/۴۶ درصد) مبتلا به یکی از انواع بدخیمی تشخیص داده شدند (جدول ۲).

جدول ۲. انواع بدخیمی‌های درجه بندی شده در این مطالعه

نوع بدخیمی	فراوانی (درصد)	درجه‌ی بدخیمی	تعداد بیمار
آدنوکارسینوما	۲۲ (۴۸/۸)	نامشخص	۱۷
CIN	۲۱ (۴۶/۶)	I	۵
		I	۱۲
		II	۹
		III	-
SCC	۲ (۴/۴)		۲

جدول ۳. توالی‌های مربوط به سوش‌های D و H به دست آمده در این پژوهش

سوش	توالی
D	CCCGTCGACCCCAAAGTTCCAAGAGGAACTGGAAGAGGGTTAGGGCTGCTTAAAGGCCGG CGTTTACCCCAAAGTTTCCAAGGACCCGGGTGGGTTTTAGGGCCCTTAAAGGGGGGA AGGGCCCCAAAAGTCCAAAAGGGCCCCGGAGAATTTTTGGGGCCCTTAAACCCAAAA AACCCCGCAACCTCACCCCTG
H	AACCAGAAGGTGCAGCCAAAAAAGGCTTTTTTCCCCTCCAAGAACCAGTGCCAAAGGG GCACCTAATAGAAAAATCATGGAAAAAAGGTAATT

جدول ۴. مطابقت توالی سوش H به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI

ردیف	شماره‌ی دسترسی	شرح	طول	همانندی (%)
۱	GQ452053.1	SEN virus isolate Guilan SENV-H4 ORF1 gene, partial cds	۱۱۹	۹۰
۲	GQ452052.1	SEN virus isolate Guilan SENV-H3 ORF1 gene, partial cds	۱۱۹	۹۰
۳	GQ452051.1	SEN virus isolate Guilan SENV-H2 ORF1 gene, partial cds	۱۱۹	۹۰
۴	AY206683.1	SEN virus strain SENV-H Orf2 gene, complete cds	۳۱۱۴	۸۹
۵	AB059353.1	SEN virus SENV-H gene, complete cds	۳۱۱۴	۸۹
۶	GQ179972.1	SEN virus isolate Guilan SENV-H1 ORF1 gene, partial cds	۱۱۹	۸۸

ناحیه‌ی ORF1، ۸۹ درصد تشابه داشت؛ ولی با سوش‌های SEN virus isolate Guilan SENV-D4 ORF1 gene با شماره‌ی دسترسی gi|241913765|gb|GQ179971.1 و SEN virus isolate Guilan SENV-D3 nonfunctional ORF1 gene با شماره‌ی دسترسی gi|241913764|gb|GQ179970.1 و SEN virus isolate Guilan SENV-D2 nonfunctional ORF1 gene با شماره‌ی دسترسی gi|241913763|gb|GQ179969.1 و SEN virus isolate Guilan SENV-D1 nonfunctional ORF1 gene با شماره‌ی دسترسی gi|241913762|gb|GQ179968.1 مطابقتی به اندازه ۹۱ درصد نشان داد. لازم به ذکر است این سوش با انواع زیادی از ایزوله‌های دیگر سوش D ویروس SEN نیز مطابقت ۹۱ درصدی داشت.

در نتیجه‌ی اصلاح توالی‌ها، یک قطعه به طول ۹۴ باز مربوط به رشته‌ی ریورس سوش H به دست آمد که توالی آن با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و بررسی شد. در مورد سوش D طول قطعه‌ی حاصل ۱۹۴ باز و مربوط به رشته‌ی ریورس این سوش بود. در نتیجه‌ی مقایسه‌ی توالی حاصل در این تحقیق با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI نتایج مربوط به سوش H در جدول ۴ نشان داده شده است. همان طور که در جدول مشاهده می‌شود در توالی‌های مختلف تشابه مشاهده شده از ۸۸ تا ۹۰ درصد متغیر بود. در نتیجه‌ی مقایسه‌ی توالی D حاصل در این تحقیق با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI، نمونه‌ی تعیین توالی شده با توالی کامل ژنوم SEN virus-D (SENV-D) و ORF1 genes با شماره‌ی دسترسی gi|18252149|gb|AY072045.1 در

میزان آلودگی به سوش های D و H

از مجموع ۱۱۷ مورد PCR انجام شده، ۱۶ مورد آلودگی به سوش D و ۱۱ مورد آلودگی به سوش H مشاهده گردید که از این تعداد ۵ نمونه همزمان با هر دو سوش آلودگی داشتند.

در مجموع از تعداد ۷۲ مورد سرویسیت مزمن مورد مطالعه ۱۴ مورد آلودگی به سوش D و ۹ مورد آلودگی به سوش H مشاهده شد که در ۴ مورد از آن ها آلودگی همزمان با هر دو سوش مشاهده گردید. سه نمونه آلوده به ویروس SEN در نمونه های سرطانی شناسایی شد. یک مورد آلوده به سوش D، یک مورد آلوده به سوش H و یک مورد آلوده به هر دو سوش D و H بود. نوع تومور در هر سه مورد آدنوکارسینوما بود.

مقایسه‌ی فراوانی آلودگی به ویروس SEN در**نمونه‌های سرویسیت و سرطانی**

در سرویسیت های مورد بررسی از ۷۲ مورد به طور کلی تعداد ۲۳ مورد آلوده به ویروس SEN شناسایی شد. در حالی که این تعداد در نمونه های توموری فقط ۴ مورد بود. اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0/007$). همچنین در مقایسه‌ی فراوانی آلودگی به سوش D بین نمونه‌های سرویسیت و نمونه‌های سرطانی، از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ($P < 0/026$). اما در آلودگی به سوش H بین نمونه‌های سرویسیت و نمونه‌های سرطانی عفونت همزمان با هر دو سوش در نمونه‌های سرویسیت و سرطانی ($P = 0/199$)، اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در نمونه‌های سرویسیت آلودگی به سوش های D و H ($P = 0/363$) و در

نمونه‌های سرطانی آلودگی به سوش های D و H ($P = 0/3836$) اختلاف معنی داری را نشان ندادند.

بحث

با توجه به این که اکثریت پژوهش های انجام شده در مورد این ویروس روی سرم بوده است و تعداد معدودی که روی بافت انجام شده است نیز مربوط به بافت های کبدی هستند؛ بنابراین مقایسه‌ی آلودگی با بافت های مشابه قابل انجام نبود. با توجه به اطلاعات در اختیار نگارنده، این تحقیق اولین مورد تحقیق روی این ویروس در بافت های رحم و گردن رحم است. این ویروس در کشورهای مختلف شیوع متفاوتی داشته و حتی در مناطق جغرافیایی مختلف یک کشور نیز پراکنش آن متفاوت است (۱۴). فراوانی ویروس در بین نمونه‌های بافت پارافینه‌ی مورد مطالعه در این پژوهش ۲۷ مورد از ۱۱۷ مورد و معادل ۲۳ درصد گزارش گردید که با مطالعه‌ای که در تهران بر روی اهداکنندگان خون انجام شد، همخوانی دارد (۶).

در سال ۲۰۱۰ فراوانی ویروس در افراد سالم در منطقه‌ی گیلان ۹۰/۸ درصد گزارش گردید و علت فراوانی بالاتر ویروس در افراد سالم در مقایسه با فراوانی گزارش شده در تهران به اختلاف شرایط اقلیمی دو ناحیه‌ی تهران و شمال کشور نسبت داده شد. بنابراین فراوانی به دست آمده در این تحقیق و سایر تحقیقات می‌تواند نشانگر اندمیک بودن ویروس با میزان شیوع متفاوت در نقاط مختلف ایران باشد. با توجه به این که استان های تهران و اصفهان از نظر اقلیمی بسیار شبیه به هم هستند، بنابراین فراوانی به دست آمده در این دو محل شبیه به هم بود. تشابه ۹۰ درصد بین توالی که در این تحقیق تعیین

ردیف شد با سوش‌هایی که پیش از این در گیلان تعیین توالی شده بودند و در عین حال تشابه ۸۹ درصد با توالی کامل این ویروس با شماره‌ی دسترسی gi|18252149|gb|AY072045.1 نشان دهنده‌ی شباهت ژنتیکی بین این ویروس‌ها در ایران است.

در این مطالعه فراوانی ویروس در افراد مبتلا به سرویسیت به طور معنی‌داری بیشتر از موارد بدخیمی یا توموری بود. در این رابطه می‌توان به این نتیجه رسید که ممکن است شرایط سلول‌های توموری برای تکثیر ویروس مناسب نباشد. این نتیجه‌گیری با این موضوع که مقدار DNA ویروس در هنگام درمان با اینترفرون کاهش می‌یابد (۱۵) هماهنگی دارد؛ چرا که میزان اینترفرون در بدخیمی‌ها نیز افزایش پیدا می‌کند (۱۶). بنابراین با این فرض که اگر این ویروس یک علت احتمالی به جز ویروس پاپیلومای انسانی برای تومورهای گردن رحم باشد باید به این نکته اشاره کرد که این ویروس فقط در مراحل اولیه یعنی ایجاد سرویسیت فعال است و در مراحل انتهایی روند ایجاد تومور قابل شناسایی نیست. با توجه به این که در مواردی از سرویسیت‌ها علت مشخصی از بین عوامل شناخته شده‌ی ایجادکننده‌ی سرویسیت را نمی‌توان معین کرد، این نوع سرویسیت‌ها بدون علت در نظر گرفته می‌شوند. با توجه به این که در سرویسیت‌های مورد مطالعه ۲۳ مورد از ۷۲ مورد (۳۱/۹۴ درصد) آلودگی به این ویروس مشاهده گردید، بنابراین می‌توان این ویروس را به عنوان یکی از علل احتمالی این نوع از سرویسیت‌ها در نظر گرفت. با توجه به این که سوش D به طور معنی‌داری در سرویسیت بیشتر دیده شد ممکن است این سوش با این بیماری ارتباط داشته باشد. البته اثبات این موضوع تحقیقات وسیع دیگری را می‌طلبد.

در این مطالعه دو مورد SCC مورد آزمایش قرار گرفت که در هیچ کدام ویروس مشاهده نشد. لازم به ذکر است این دو مورد در بررسی قبلی توسط میرزایی کاشانی (۱۷) از نظر ویروس پاپیلومای انسانی نیز منفی بوده‌اند. با توجه به ارتباط مشخص بین SCC و ویروس پاپیلومای انسانی، عدم تشخیص ویروس SEN می‌تواند به همان دلیلی باشد که ویروس پاپیلومای انسانی مورد شناسایی قرار نگرفته است، هر چند این نتیجه‌گیری باید با تعداد بیشتری از نمونه بررسی و تکرار شود.

این فرض که ویروس پاپیلومای انسانی عامل ایجاد SCC و انواع بدخیمی‌های رحم و گردن رحم است تا حدود زیادی اثبات شده است ولی عدم شناسایی آن را در SCC می‌تواند به دلیل فقدان شرایط مناسب برای ویروس در یک سلول سرطانی باشد. این بدین معنی است که ویروس سلول را به سمت سرطانی شدن هدایت می‌کند ولی نمی‌تواند در آن دوام داشته باشد. می‌توان این نظریه را در مورد ویروس SEN هم تعمیم داد؛ چرا که این ویروس به مقدار زیاد در سرویسیت‌ها شناسایی شده ولی در سرطان‌ها موجود نبوده است. لازم به ذکر است در تمام موارد SCC و یا انواع دیگر سرطان‌های گردن رحم و رحم ویروس پاپیلومای انسانی قابل شناسایی نیست (۱۷) و امکان وجود عامل یا عوامل احتمالی دیگری برای این سرطان‌ها مطرح است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت مالی کامل این تحقیق (پایان‌نامه شماره‌ی ۷۵۹۲) تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Primi D, Fiordalisi G, Mantero G. Inventors identification of SENV Genotypes. International patent number WO0028039 (international application published under the patent cooperation treaty [Online] 2000 [cited 2000 May 18];. Available from URL: <http://v3.espacenet.com>.
2. Hosseini-Moghaddam SM, Mousavi SH, Alavian SM. Is SEN Virus a major concern in hemodialysis and liver transplantation? *Hepatitis Monthly* 2009; 9(1): 50-9.
3. Kojima H, Kaita KD, Zhang M, Giulivi A, Minuk GY. Genomic analysis of a recently identified virus (SEN virus) and genotypes D and H by polymerase chain reaction. *Antiviral Res* 2003; 60(1): 27-33.
4. Tanaka Y, Primi D, Wang RY, Umemura T, Yeo AE, Mizokami M, et al. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. *J Infect Dis* 2001; 183(3): 359-67.
5. Moriondo M, Resti M, Betti L, Indolfi G, Poggi GM, de MM, et al. SEN virus co-infection among HCV-RNA-positive mothers, risk of transmission to the offspring and outcome of child infection during a 1-year follow-up. *J Viral Hepat* 2007; 14(5): 355-9.
6. Sharifi Z, Mahmoodian-Shooshtari M, Talebian A. The prevalence of SEN virus infection in blood donors in Iran. *Arch Iran Med* 2008; 11(4): 423-6.
7. Karimi-Rastehkenari A, Bouzari M. High frequency of SEN virus infection in thalassemic patients and healthy blood donors in Iran. *Virology* 2010; 7: 1.
8. Dalal A, Yi CL. Etiology of Carcinoma of cervix. In: Purandare CN, Patel MA, editors. *Gynecological Cancer*. New Delhi: Jaypee Brothers; 2006. p. 153-7.
9. International Agency for Research on Cancer. *Cervix Cancer Screening Biennial Report (2004-2005)*. Geneva: World Health Organization; 2006.
10. Sagir A, Adams O, Antakyali M, Oette M, Erhardt A, Heintges T, et al. SEN virus has an adverse effect on the survival of HIV-positive patients. *AIDS* 2005; 19(10): 1091-6.
11. Schroter M, Laufs R, Zollner B, Knodler B, Schafer P, Sterneck M, et al. Prevalence of SENV-H viraemia among healthy subjects and individuals at risk for parenterally transmitted diseases in Germany. *J Viral Hepat* 2002; 9(6): 455-9.
12. Pirovano S, Bellinzoni M, Ballerini C, Cariani E, Duse M, Albertini A, et al. Transmission of SEN virus from mothers to their babies. *J Med Virol* 2002; 66(3): 421-7.
13. Altarescu G, Eldar-Geva T, Brooks B, Zylber-Haran E, Varshaver I, Margalioth EJ, et al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for nonsyndromic deafness by polar body and blastomere biopsy. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26(7): 391-7.
14. Akiba J, Umemura T, Alter HJ, Kojiro M, Tabor E. SEN virus: epidemiology and characteristics of a transfusion-transmitted virus. *Transfusion* 2005; 45(7): 1084-8.
15. Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, Orii K, Yeo AE, Shih JW, et al. SEN virus: response to interferon alfa and influence on the severity and treatment response of coexistent hepatitis C. *Hepatology* 2002; 35(4): 953-9.
16. Abbas AK, Prober JS, Litchman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: Saunders; 2003.
17. Mirzaeekashani E. Identification of HPV in Cervical Cancers and Cervicitis [MSc Thesis]. Isfahan: Unevercity of Isfahan; 2008.

Frequency of SEN Virus in Cervicitis and Cervical Cancers in Isfahan

Mohammad Bahabadinejad MSc¹, Majid Bouzari PhD², Ardeshir Talebi MD³

Abstract

Background: SEN virus is mainly transmitted via blood and its relationship with different diseases is under investigation. The prevalence of SEN-V in healthy individuals, including blood donors, clearly differs geographically. Female genital lesions range from mild infections without symptoms such as chronic cervicitis to various cancers. This study was done to investigate the possible correlation of SEN virus infection with cervicitis and cervical tumors.

Methods: In this study, 117 samples of formalin fixed paraffin embedded biopsies of uterus and cervix were subjected to nested PCR to detect D and H strains of SEN-V. After extraction from gel, two PCR products were sequenced and compared with the sequences in Gene Bank. Fisher's exact test was used for statistical analyses.

Findings: High homology with D and H strains was observed. SEN-V was detected only in 4 cases of 45 cancer samples which one was positive for H, one for D and one for both strains. Out of 72 cervicitis cases 13 and 9 subjects were positive for D and H strains respectively. Compare to cervical cancers, the frequency of infection was higher in cervicitis cases (30%) ($P > 0.05$).

Conclusion: May be there is a correlation between SEN-V infection with cervicitis, especially in chronic cases with unknown etiology which needs more studies to be proved.

Keywords: SEN Virus, Cervicitis, Uterus cancers, Polymerase chain reaction (PCR).

¹ Section of Microbiology, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

² Associate Professor, Section of Microbiology, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

³ Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Majid Bouzari PhD, Email: bouzari@sci.ui.ac.ir