



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

التشخيص الجزيئي لفايروسات الورم الحليمي البشري عالية الخطورة بأستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد و تسلسل الجيل القادم من عينات عنق الرحم السريرية

أطروحة مقدّمة

إلى مجلس عمادة كليّة التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل

أنفال محمد جمعة ذياب الجبوري

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة -جامعة ديالى 2014
ماجستير أحياء مجهرية / علوم حياة-كليّة التربية للعلوم الصرفة-جامعة ديالى 2018

بإشراف

أ. د. عبد الرزاق شفيق حسن

أ.م. د. أسماء حسيب هويد

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Diyala
College of Education and Pure Science
Department of Biology



Molecular Detection of High-Risk Human Papilloma Viruses by Polymerase Chain Reaction and Next Generation Sequencing of Clinical Cervical Samples

A Thesis

Submitted to the College of Pure Science, University of Diyala in a Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biology

By

Anfal Mohammed Jumaa Al-joburi

B.Sc. Biology, College of Education for Pure Science ,University of Diyala - 2014

M.Sc. Microbiology , College of Education for Pure Science, University of Diyala – 2018

Supervised by

Assist. Prof.Dr.

Asmaa Haseeb Hwaid

1446 A.H

Prof. Dr.

Abdulrazaq Shafiq Hasan

2024 A.D.

1. المقدمة : Introduction

فيروس الورم الحليمي البشري (Human Papilloma Virus) هو فيروس صغير، غير مغلف، ذو غلاف بروتيني عشروني الواجه، يحتوي على حامض نووي (DNA) و يتكاثر داخل نواة الخلايا الظهارية الحرشفية (Araldi و اخرون، 2018). تصيب فيروسات الورم الحليمي البشري (HPV) الأنسجة الظهارية (الجلد والأغشية المخاطية) من خلال الاتصال الجنسي أو التلامس المباشر، مما يؤدي إلى ظهور بقع جلدية متزايدة النمو مما يُعرف (بالتآليل أو الأورام الحليمية) (Warts or papillomas) (Manini و Montomoli ، 2018). معظم سلالات فيروس الورم الحليمي البشري (HPV) غير ضارة، ومع ذلك، هناك بعض السلالات عالية الخطورة (High-risk) تؤدي إلى ظهور خلايا غير طبيعية في بطانة عنق الرحم والتي يمكن أحيانًا أن تتطور إلى سرطان منها سرطان عنق الرحم (Tota و اخرون، 2017). بسبب فيروس الورم الحليمي البشري أورام خبيثة أخرى مثل سرطان الشرج والقضيب والحنجرة (De Martel و اخرون، 2017) . يتم تشخيص النساء على أنهن مصابات بفيروس الورم الحليمي البشري نتيجة لاختبار (pap smear) الذي يظهر وجود خلايا غير طبيعية ، وهذا الاختبار يُجرى للنساء للكشف عن الخلايا الغير طبيعية في بطانة عنق الرحم قبل أن تتطور الى سرطان عنق الرحم cervical cancer (Jeronimo و اخرون، 2016).

تعتمد الية تكوّن الأورام السرطانية في فيروسات الورم الحليمي على نشاط بروتينات الورم الخبيث (E6 و E7) ، التي تقوم بتدمير البروتينات المثبطة للأورام الخلوية، وهي بروتين 53 protine (p53) و بروتين مثبط ورم الشبكية (pRb) (Heo و اخرون، 2018) ، و قد تم العثور على أكثر من 200 نمط من فيروس الورم الحليمي البشري (HPV) ، ويمكن تقسيمها إلى مجموعتين اعتمادًا على قدرتها السرطانية عالية الخطورة (High risk (HR) ومنخفضة الخطورة Low

(LR) risk (Crow و اخرون، 2010) ، تقريباً (99%) من حالات سرطان عنق الرحم مرتبطة بوجود عدوى فيروس الورم الحليمي البشري (HPV) (Wang و اخرون، 2018) ، حيث يعتبر سرطان عنق الرحم ثاني أكثر الأورام الخبيثة شيوعاً بين النساء. ونتيجة لذلك، يعتبر الكشف عن فيروس الورم الحليمي البشري أمراً ضرورياً للحد من حدوث سرطان عنق الرحم واضطرابات أخرى مرتبطة بفيروس الورم الحليمي البشري (Zhao و اخرون، 2021) في معظم الحالات، تكون الإصابة بفيروس الورم الحليمي البشري عابرة ويتم القضاء عليها بواسطة جهاز المناعة و في حالات أخرى، قد يبقى الفيروس كامناً ويسبب مجموعة متنوعة من الأمراض في الجهاز التناسلي الأنثوي (Runge و اخرون، 2019).

ان فهم العلاقة بين هذه العدوى الفيروسية وسرطان عنق الرحم أدى إلى تطوير لقاحات وقائية، تمت الموافقة عليها للاستخدام في عام 2006 ومنذ ذلك الحين، زاد استخدام هذه اللقاحات تدريجياً في برامج تطعيم السكان حول العالم (Mesher و اخرون، 2016). و من المرجح أن يؤثر التطعيم الواسع النطاق ضد فيروس الورم الحليمي البشري على تنوع الفيروس الموجود في الطبيعة (Markowitz و اخرون، 2010). هناك حالياً ثلاث لقاحات معتمدة متاحة لفيروس الورم الحليمي البشري، لقاح ثنائي التكافؤ bivalent (16 و 18)، لقاح رباعي التكافؤ tetra-valent (6 ، 11 ، 16 ، و 18)، ولقاح ذو التكافؤ تسعة nine-valent (6 ، 11 ، 16 ، 18 ، 31 ، 33 ، 45 ، 52 ، و 58). ومع ذلك، جميع هذه اللقاحات التجارية المتاحة حالياً توفر الحماية فقط ضد بعض الأنماط الجينية بناءً على البيانات الوبائية من البلدان الغربية (Liao و اخرون، 2020).

يختلف معدل انتشار عدوى فيروس الورم الحليمي البشري وتوزيع الأنواع حسب كل بلد وموقعه (Chen و اخرون، 2015)، في العراق على وجه الخصوص، بينت اغلب الدراسات ان النمط (16 و 18) يعدان الاكثر انتشار بين النساء (Ali و اخرون، 2014؛ Abdul-samad و Kandala ، 2018؛

Othman و اخرون، 2022). سجلت مؤخرًا نسبة عالية من فيروس الورم الحليمي البشري 51 في عدة دراسات أُجريت في اسكتلندا، إيطاليا، وفي دراسات صغيرة على النساء الإيجابيات والسلبيات لفيروس نقص المناعة المكتسبة في ساو باولو، البرازيل (Bowden و اخرون 2021).

يدرس علم الجينات الميكروبي (metagenomics) المادة الوراثية للكائنات الحية الدقيقة مباشرة، بما في ذلك البكتيريا والفطريات والفيروسات، الموجودة في عينة معينة (Perlejewski و اخرون، 2020)، تستخدم تقنية (Metagenomic) بشكل متزايد في الكشف عن فيروسات الورم الحليمي البشري (HPV) ، وتعد من الأساليب الحديثة والفعالة في هذا المجال. هذه التقنية تهدف إلى تحليل الحمض النووي (DNA) الموجود في العينات البيولوجية بدون الحاجة إلى استخدام تقنيات متقدمة للتشخيص. تمكن هذه التقنية من اكتشاف سلالات جديدة من HPV التي قد تكون غير معروفة أو نادرة و يمكن استخدامها لفهم توزيع السلالات المختلفة من HPV في السكان والمناطق المختلفة (Wilson و اخرون، 2014) . توفر (Metagenomic) دقة عالية في التحليل الجيني وتقدم صورة شاملة للتنوع الفيروسي في العينة، و توفير معلومات حول الفيروسات الأخرى إذا كانت موجودة و تواصل الأبحاث الحديثة استخدام تقنية (Metagenomic) لاكتشاف الفيروسات وفهم أنماط الانتشار والتفاعلات المتعددة لفيروسات الورم الحليمي البشري، و توسع تقنية (Metagenomic) إمكانيات الكشف عن HPV ، مما يساهم في تحسين التشخيص وفهم التنوع الفيروسي بطريقة شاملة ودقيقة (Perlejewski و اخرون، 2020).

ان تطوير وتحسين أساليب فحص (HPV) وتشخيص الإصابة به تمثل جزءًا هامًا من الأبحاث العلمية و هذا يشمل استخدام التقنيات الجزيئية المتقدمة لتحديد انماط الفيروس الوراثية المختلفة، لذلك فإن فهم التفاعلات بين (HPV) والخلايا المضيفة وكيفية تأثيره على تطوير الأورام

السرطانية يعزز من الجهود المبذولة لتطوير أهداف جديدة للعلاج والوقاية و بشكل عام، تقدم الدراسات حول فيروس الورم الحليمي البشري فرصًا كبيرة لتوسيع المعرفة في هذا المجال المهم للصحة العامة والطب السريري والأبحاث العلمية.

أهداف الدراسة :

- 1- البحث عن العلاقة بين عدوى فيروس الورم الحليمي البشري ذو المخاطر العالية والحالة الاجتماعية والديموغرافية، بيانات الحمل و الولادة و العلامات السريرية.
- 2- - الكشف الجزيئي وتحديد الانماط الجينية لـ 14 نوعًا من فيروس الورم الحليمي البشري عالي الخطورة باستخدام تقنية الـ (Real Time-PCR) .
- 3- استخدام تقنية تسلسل الجينوم الكامل للأنماط الجينية من فيروس الورم الحليمي البشري باستخدام (metagenomic) و تحليل النتائج تطويرًا.

Summary

Human Papillomavirus (HPV) is a large group of viruses with double-stranded circular DNA. These viruses can infect the superficial surfaces (skin and genital mucosa) through sexual or direct contact, leading to rapidly growing skin lesions (known as warts or papillomas), some types cause benign skin lesions (considered low-risk), while others can increase the risk of developing cancer (considered high-risk). Samples were collected from Baghdad Teaching Hospital/City of Medicine/Baghdad from August 1, 2023, to December 1, 2023.

The present study aimed at molecular detection and identification of the genetic types of 14 high-risk HPVs using Real Time-PCR, and determination the relationship between high-risk HPV infection and social and demographic status, pregnancy and birth data, clinical signs results. Whole genome sequence of the common HPV using metagenomic.

A total of 80 samples were examined. Their ages ranged from 22 to 62 years, with an average age of 36.95 ± 1.01 years. The exclusion criteria were unmarried women, pregnant women, women experiencing severe non-menstrual bleeding, and women who had undergone hysterectomy.

The viruses were diagnosed using real-time PCR using HPV genotypes 14 Real-TM Quant assay. Subsequently, eight samples were selected for an evolutionary study using next-generation sequencing (NGS) technology for whole genome sequencing.

Regarding the molecular detection of high-risk human papillomavirus (HPV) genotypes, the current study revealed that all cervical samples were positive for (HPV) 80 (100%). Among which, 74 (92.5%) showed a single infection, meaning they carried only one type of HPV. Additionally, there were six

SUMMARY

samples (7.5%) that exhibited dual infection, indicating they had two types of high-risk HPV. The results showed that the most prevalent high-risk genotype of human papillomavirus (HPV) in cervical samples from the participating women in the study was genotype 51. All samples tested were positive for genotype 51, whether single or dual infections.

Most women infected with high-risk HPV, 36 (45%) were between 26 and 35 years old ($P < 0.001$). The majority of women infected with high-risk HPV, 44 (55%), lived in rural areas. As for education level, 48 (60%) ($P < 0.001$) women had elementary school education. Regarding marital status, 78 (97.5%) ($P < 0.001$) were married, with the majority, 41 (51.25%) ($P < 0.001$) are married for 6–15 years, averaging 15.28 ± 0.94 years. Regarding the number of children, the majority of women, 37 (46.25%) ($P < 0.001$), had 3–4 children.

Regarding pregnancy and childbirth factors among women infected with high-risk HPV, excluding history of cesarean section, the current study revealed that 55(68.75%) ($P < 0.001$) of women did not have a history of miscarriage, 49 (61.25%) ($p = <0.02$) did not use oral contraceptives, 62 (77.5%) ($p = <0.001$) did not use intrauterine devices (IUDs), and 55(68.75%) ($p = <0.001$) did not have a history of uterine dilation and curettage. Regarding the number of cesarean births, the majority of women infected with high-risk HPV 54 (67.5%) had a history of cesarean section, with percentages of 21.25%, 3.75%, and 6.25% for ≤ 2 births, 3-4 births, and $>$ five births, respectively.

As for the clinical symptoms among women, the results revealed that 63 (78.75%) ($p = <0.001$) 96.25% of women infected with high-risk HPV did not have chronic diseases, 69 (86.25%) ($p = <0.001$) did not have a family history of

SUMMARY

cancer, and 77 (96.25%) ($p = <0.001$) were non-smokers. However, other clinical signs were evident, with the majority of women infected with high-risk HPV 74(92.5%) ($p = <0.001$) 92.5%) experiencing pain, 61(76.25%) ($p = <0.001$) discharge, and a single infection, respectively. Regarding bleeding symptoms, half of the women experienced bleeding, while the other half did not. Lastly, most symptoms 43(53.75%) ($p = <0.001$) persisted for two months or less.

In this study, the nucleic acids of the main viruses in the cervical region of women infected with Human Papillomavirus (HPV) were analyzed using Next-Generation Sequencing (NGS) technology. Specifically, metagenomic analysis was chosen to study the virome content of eight samples were positive for HPV. These eight samples were selected based on their viral load of the tested samples. The viral content of these samples was determined using Illumina DNA Prep with the iSeq100 System. The results of the virome analysis conducted on cervical samples from women infected with human papillomavirus (HPV) revealed a diverse viral community. In addition to HPV, other human viruses were discovered, such as the herpesvirus (HHV-4) and the human immunodeficiency virus (HIV).

The current study suggests that the high prevalence of Human Papillomavirus (HPV) genotype 51 may play a major role in the development of HPV-related cervical diseases in women. Future epidemiological investigations are needed to enhance the findings of the current study and to understand the collective role that co-infections of HPV play in the development of cervical cancer.