

# Molecular Identification of Human Papilloma Virus in Tissue Samples from Patients with Cervical Cancer by Multiplex PCR Method

Zahra Masoumalinejad <sup>1</sup>, Mohammad Reza Zinatizadeh <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Sirjan Branch of Islamic Azad University, Sirjan, Iran

<sup>2</sup> Department of Genetics, Faculty of Science, Tonekabon Branch of Islamic Azad University, Mazandaran, Iran

\* **Corresponding author:** Mohammad Reza Zinatizadeh, Department of Genetics, Faculty of Science, Tonekabon Branch of Islamic Azad University, Mazandaran, Iran. Tel: 09378775443; E-mail: [zinati3333@gmail.com](mailto:zinati3333@gmail.com)

Received: 2017/12/7

Accepted: 2018/01/27

Online published: 2018/01/28

## Abstract

**Introduction:** Contamination with high-risk human papillomavirus (HPV) is one of the most important risk factors for developing cervix cancer. Since there is no possibility of detecting the virus and its subtypes by using serological methods and cell culture, the molecular methods such as multiplex PCR have particular importance in accurate, early and definite diagnosis of this virus. So, in this research, our goal is to use a proprietary multiplex PCR assay based on HPV-16 and HPV-18 of human papillomavirus for molecular recognition of HPV and to evaluate its prevalence in cervix cancer patients.

**Materials and Methods:** In this experimental study, after collecting samples from malignant cervical lesions of the 60 patients, the viral DNA was extracted and multiplex PCR was done by specific primers of human papillomavirus in all samples. After the analysis of multiplex PCR products by 1% agarose gel electrophoresis, specificity of the test was also evaluated.

**Results:** Among 60 samples, 19 cases were confirmed to be positive for HPV contamination and 41 cases were negative. Therefore the prevalence of HPV contamination was reported 30% in this population.

**Conclusions:** This study showed that Multiplex PCR by specific primers for HPV-16 and HPV-18 of human papilloma virus is a proper and accurate method for detection of this virus and the results also confirm the previous reports of correlation between HPV and cervical carcinoma in Iranian population.

**Keywords:** Cancer of Cervix, Human Papilloma Virus, Multiplex PCR Method

©2017 Deputy of Research and Technology of Baqiyatallah Hospital

## شناسایی مولکولی پاپیلوما ویروس انسانی در نمونه‌های بافتی بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم به روش PCR چندگانه

زهرا معصومعلی نژاد<sup>۱</sup>، محمد رضا زینتی زاده<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

<sup>۲</sup> گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، مازندران، ایران

\* نویسنده مسئول: محمد رضا زینتی زاده، گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن،

مازندران، ایران. تلفن: ۰۹۳۷۸۷۷۵۴۴۳؛ ایمیل: [zinati3333@gmail.com](mailto:zinati3333@gmail.com)

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۸

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۷

دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۶

### چکیده

**مقدمه:** آلوده شدن با انواع پر خطر پاپیلوماویروس فاکتور مهمی در بروز سرطان دهانه رحم می‌باشد. از آن جا که با استفاده از روش‌های سرولوژیک و کشت سلولی، امکان تشخیص این ویروس و انواع آن وجود ندارد، روش‌های مولکولی از جمله PCR چندگانه در تشخیص دقیق، قطعی و زودهنگام این ویروس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. لذا هدف از این پژوهش، استفاده از یک سنجش PCR چندگانه اختصاصی بر روی پاپیلوماویروس ۱۶ و ۱۸ انسانی، جهت تشخیص مولکولی پاپیلوماویروس و بررسی فراوانی آن در نمونه‌های بیماران می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، پس از جمع‌آوری نمونه از ضایعات بدخیم دهانه رحم بیماران مختلف، DNA ویروسی ۶۰ نمونه بالینی استخراج شد و PCR چندگانه با پرایمرهای اختصاصی ویروس پاپیلوماویروس انسانی، بر روی نمونه‌های فوق انجام گرفت. پس از بررسی محصولات PCR چندگانه تولید شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد، اختصاصی بودن این تست نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** از میان ۶۰ نمونه بیمار، ۱۹ مورد از نظر آلودگی به ویروس پاپیلوماویروس مثبت و ۴۱ مورد منفی بودند که حاکی از فراوانی وجود این ویروس در این جمعیت از بیماران دچار کانسر دهانه رحم (حدود ۳۰ درصد) گزارش گردید.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که روش PCR چندگانه با پرایمرهای اختصاصی پاپیلوماویروس ۱۶ و ۱۸ روشی مناسب و دقیق برای تشخیص ویروس پاپیلوماویروس انسانی است و این یافته‌ها موید گزارش‌های پیشین مبنی بر ارتباط میان پاپیلوماویروس انسانی و سرطان دهانه رحم در بیماران ایرانی می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** سرطان دهانه رحم، ویروس پاپیلوماویروس انسانی، روش PCR چندگانه

تمامی حقوق نشر برای معاونت پژوهش بیمارستان بقیه الله محفوظ است.

## مقدمه

سرطان دهانه رحم دومین علت مرگ و میر در اثر سرطان در بین زنان می‌باشد. میزان ابتلا به سرطان دهانه رحم در کشورهای درحال توسعه، به علت به اجرا گذاشته نشدن برنامه‌های غربالگری مؤثر، بتدریج رو به افزایش می‌باشد [۱]. تقریباً از هر ۸ زن، یک نفر مبتلا به سرطان پستان و سرطان دهانه رحم می‌باشد که در اغلب اوقات منجر به برداشتن کامل بافت پستان و رحم، شیمی درمانی، پرتو درمانی و هورمون درمانی می‌گردد. در کشورهای توسعه یافته یکی از علل اصلی مرگ و میر زنان سرطان پستان و دهانه رحم است که در ۵۰ تا ۸۰٪ موارد علل اصلی آن ناشناخته است [۲، ۳]. با این وجود عوامل مستعد کننده دیگری از قبیل داشتن شرکای جنسی متعدد، وجود نقص سیستم ایمنی، مصرف قرص‌های ضدبارداری و سیگار در بروز سرطان دهانه رحم نقش دارند [۴].

## روش کار

مهم‌ترین و شناخته شده ترین 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 و مطالعات مختلف صورت گرفته در سراسر جهان نشان دهنده ارتباط قوی میانویروس پاپیلومای انسانی و تغییرات پیش سرطانی و سرطانی در سلول‌های اپیتلیال می‌باشند [۶]. ویروس پاپیلومای انسانی به عنوان یکی از علل سرطان‌های آنژینتال، منجمله سرطان دهانه رحم شناخته می‌شود [۷-۹]. بیش از ۱۰۰ تیپ مختلف از ویروس پاپیلومای انسانی با کمک روش‌های مولکولی شناخته شده است. از میان تیپ‌های مختلف HPV ۱۶ و HPV ۱۸ حدود ۷۰٪ درصد سبب آلودگی‌های مخاطی، بخصوص در نواحی آنژینتال می‌باشند [۱۰، ۱۱]. بر این اساس ضروری به نظر می‌رسد که شایع‌ترین تیپ ویروس پاپیلومای انسانی در هر جمعیت به صورت جداگانه تعیین گردیده تا بتوان از آن‌ها برای طراحی یک برنامه غربال گری مؤثر، مدیریت بیماری و در نهایت واکسیناسیون جمعیت هدف برعلیه تیپ‌های ویروسی شایع ویا به عنوان پروفیلاکسی برای همه زنان استفاده کرد. 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 مولکولی از جمله PCR از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند [۱۲]. و مطالعات مورفولوژیک نیز حتی با اعمال تکنیک‌های نوین مانند Liquid-based به تنهایی حساسیت خیلی بالایی برای تشخیص ندارند [۱۳]. لذا در این پژوهش، از روش PCR چندگانه به منظور تشخیص مولکولی ویروس پاپیلومای انسانی در بیماران مبتلا به سرطان گردن رحم صورت گرفت. باتوجه به اینکه تیپ‌های HPV ۱۶ و HPV ۱۸ پرخطر بوده و عامل

## یافته‌ها

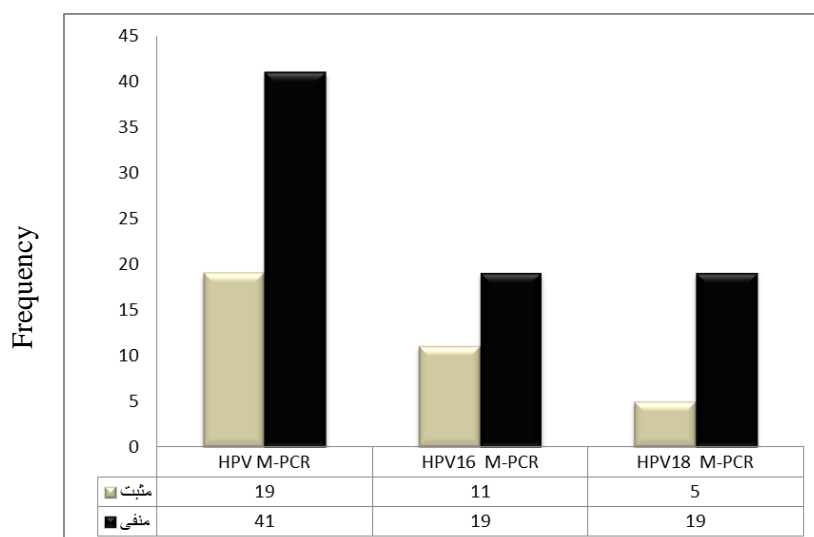
نتیجه تست اختصاصیت PCR چندگانه با استفاده از پرایمرهای عمومی (MY09/MY1) و پرایمرهای اختصاصی (HPV ۱۶ و HPV ۱۸) جهت شناسایی ویروس پاپیلومای

وجود ۱۶ HPV و ۵ نمونه از نظر وجود ۱۸ HPV مثبت بودند (تصویر ۱). به عبارت دیگر میزان فراوانی عفونت ویروس پاپیلوماوی انسانی در این جمعیت حدود ۳۰ درصد گزارش گردید (تصویر ۲).

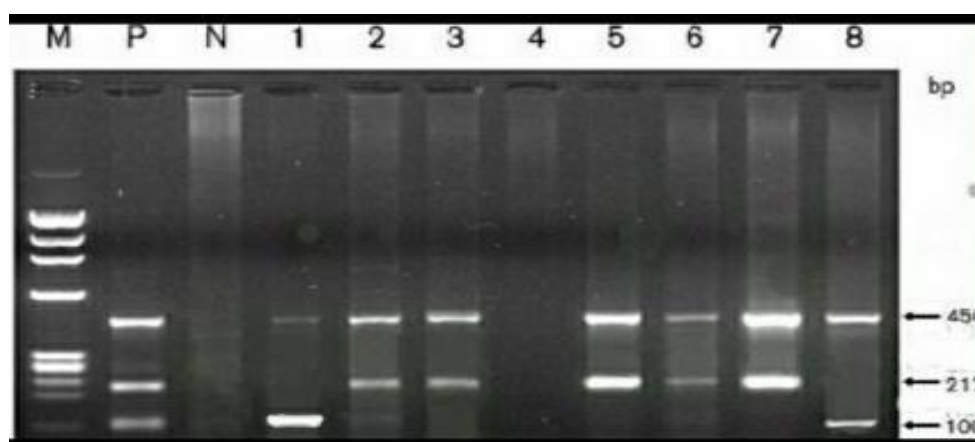
انسانی استفاده شد. براساس نتایج PCR چندگانه (۶۰ نمونه)، ۱۹ نمونه (۳۱/۶٪) از نظر وجود ویروس پاپیلوماوی انسانی مثبت و ۴۱ نمونه (۶۸/۴٪) ویروس پاپیلوماوی انسانی منفی گزارش شد. از ۱۹ نمونه ویروس پاپیلوماوی انسانی، ۱۱ نمونه از نظر

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Primers	Sequence
MY09/MY1	Product size: 450 bp 5' CGTCCACAAGAGGGGATACTGATC3' 5' GCACCAGGGATCATAACTAATGG3'
16 HPV	Product size: 217 bp 5' ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG3' 5' CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC3'
18 HPV	Product size: 100 bp 5' CTTTCGGGTGGCACTACATTGG3' 5' AAGCGCCAGCAGTATTTTCATC3'



تصویر ۱: نتایج PCR چندگانه پاپیلوما ویروس انسانی (HPV ۱۶ و HPV ۱۸) در ۶۰ نمونه بافتی دهانه رحم



تصویر ۲: بررسی محصول PCR چندگانه پاپیلوما ویروس انسانی (HPV ۱۶ و HPV ۱۸) بر روی ژل ۱٪ M: مارکر، P: کنترل مثبت (پلاسمید HPV-18=100bp و HPV-16 = 217bp)، N: کنترل منفی، چاهک‌های ۱ و ۸ نمونه‌های مثبت HPV ۱۸، چاهک‌های ۲ و ۳ و ۵ و ۶ و ۷ نمونه‌های مثبت HPV ۱۶، چاهک ۴ نمونه منفی.

## بحث

Meshkat و همکاران در سال ۲۰۰۶ پژوهشی در مورد تشخیص ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ و ۱۸ با روش RFLP PCR در نمونه‌های سرطان گردن رحم با پارافین جاسازی شده انجام دادند. بیش از ۲۰۰ تیپ ویروس پاپیلومای انسانی براساس توالی DNA ژنومی شناخته شده است که ۸۵ تیپ از ویروس پاپیلومای انسانی به خوبی مشخص و ۱۲۰ تیپ دارای ژنوتیپ‌های جدید هستند [۲۸]. Stamenkovic و همکاران در سال ۲۰۱۶ توزیع ویروس پاپیلومای انسانی در بافت سرطان گردن رحم را بررسی کردند. ژنوتیپ ویروس پاپیلومای انسانی در ۱۹ تا ۳۲ نمونه مثبت مشخص شد. ۶ ژنوتیپ پرخطر شامل ۵۸/۵۳/۴۵/۳۳/۱۸/۱۶ وجود داشت که در این میان ۱۶ HPV شایع‌ترین آن‌ها بود. انواع دیگر (نوع ۱۸، ۳۳، ۴۵، ۵۸) در یک مورد پیدا شد (۵/۲۶٪). در یک نمونه بافت دو نوع HPV ۱۶ و HPV ۵۳ مشخص شد [۲۹].

کیهانی و همکاران در سال ۱۳۸۵ فراوانی عفونت ویروس پاپیلومای انسانی در ضایعات بدخیم دهانه رحم به روش PCR چندگانه را مورد بررسی قرار دادند. ۱۰۰ نمونه از ضایعات پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم انتخاب شدند. استخراج DNA از بلوک‌های پارافینی با روش استاندارد انجام گرفت. PCR چندگانه با استفاده از دو جفت پرایمر صورت پذیرفت و محصولات PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ برده شد. در این جمعیت از میان ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان دهانه رحم، ۷۳ نفر از نظر عفونت HPV مثبت و ۲۷ مورد منفی بودند. یافته‌های حاصل از این مطالعه، گزارش‌های پیشین مبنی بر ارتباط میان ویروس پاپیلومای انسانی و سرطان دهانه رحم را تقویت کرد [۳۰]. جبارپور بنیادی و همکاران در سال ۱۳۸۷ تحقیقی بر روی تعیین انواع انکوژن ویروس پاپیلومای انسانی به روش PCR چندگانه در ضایعات سرطانی دهانه رحم در منطقه شمال غرب ایران انجام دادند. در این تحقیق نمونه تثبیت شده در فرمالین و محصور در پارافین از نظر وجود DNA چهار تیپ شایع ویروس پاپیلومای انسانی (تیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳) با استفاده از دو سری PCR اختصاصی مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج نشان داد که حضور عفونت همزمان با برخی از انواع ویروس پاپیلومای انسانی و نیز شیوع نسبتاً متفاوت برخی از انواع این ویروس در جمعیت مورد مطالعه، می‌تواند راه گشای برنامه ریزی‌های آینده جهت غربالگری و مدیریت این بیماری مهم و در آینده‌های نه چندان دور، واکسیناسیون بر علیه تیپ‌های شایع باشد [۳۱].

Kan و همکارانش ۵۰ نمونه سرطان اندوسرویکس را با روش PCR برای انواع HPV ۱۶، HPV ۱۸ و HPV ۳۳ مورد بررسی قرار دادند و ژنوم HPV ۱۸ را دو نمونه سرطان رحم

سرطان دهانه رحم شایع‌ترین نوع سرطان در کشورهای در حال توسعه بشمار می‌رود. سالانه بیش از ۴۰۰۰۰۰ مورد بدخیمی در جهان گزارش می‌گردد که تقریباً ۱۲٪ سرطان‌های شایع در بین زنان را شامل می‌گردد [۱۵]. در مطالعه حاضر بافتهای سرطانی دهانه رحم به منظور بررسی حضور عفونت ویروس پاپیلومای انسانی جمع‌آوری و با روش PCR چندگانه (M-PCR) مورد بررسی قرار گرفته است که نشان دهنده میزان آلودگی ۳۰ درصدی با ویروس پاپیلوما انسانی است. میزان شیوع سالیانه کارسینوم مهاجم دهانه رحم در حدود ۱۷/۳ درصد در زنان برای تمام سنین و ۲۷ درصد در زنان برای سنین بالای ۲۰ سالگی می‌باشد [۱۶]. دو مطالعه‌ای که در اسپانیا و کلمبیا انجام شده بود DNA مربوط به HPV را در حدود ۷۵٪ از موارد بیمار تشخیص داده بودند [۱۷-۱۹]. هم چنین طی گزارش نیاکان و همکاران که در سومین کنگره سراسری میکروبیولوژی ایران در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی همدان ارائه گردید، میزان موارد مثبت ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی در ضایعات دهانه رحم ۷۰٪ گزارش شد که البته در آن مطالعه از روش هیبریداسیون مولکولی استفاده شده بود [۲۰]. یافته‌های مطالعه‌ای نشان داد زانی که ۱۲ بار زایمان کرده بودند شیوع این سرطان ۵ برابر بیشتر از زانی بود که حداکثر سه بار زایمان داشته‌اند. هم چنین میزان شیوع آن در زانی که بعد از ۱۹ سالگی فعالیت‌های جنسی را آغاز کرده بودند دو برابر کمتر از زانی بود که در زمان آغاز فعالیت جنسی کمتر از ۱۵ سال داشتند [۲۱، ۲۲]. بر اساس مطالعات مورد شاهدهی بسیاری که تاکنون انجام گرفته عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی بعنوان عامل اصلی توسعه نئوپلازی و بدخیمی در اپی تلیال ناحیه تناسلی شناسایی شده است و بویژه زمانی که عفونت پایدار با تیپ‌های پرخطر این ویروس صورت گرفته باشد این مسئله بارزتر خواهد بود [۲۳]. ضایعات دهانه رحم به فرم خفیف سروسیست، ضایعات اپی تلیالی به صورت خفیف (LSIL: Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion) و شدید (HSIL: High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion) و سرطان دهانه رحم ناشی از عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی می‌تواند وجود داشته باشد. این ضایعات بر طبق طبقه بندی Bethesda به صورت CINI، CINI و CINI یا CIS طبقه بندی می‌شود. معمول‌ترین تیپ ویروس پاپیلومای انسانی انواع ۱۶ و ۱۸ هستند، اما عفونت با تیپ ۱۶ و ۱۸ نیز معمول می‌باشد [۲۴-۲۶]. بیش از ۹۹٪ از موارد سرطان رحم، توسط ویروس پاپیلومای انسانی روی می‌دهد. مطالعات اروپایی‌ها عمدتاً بر روی انواع HPV ۱۶ و HPV ۱۸ متمرکز شده [۲۷].

مؤثر است [۳۶]. طی سال‌های اخیر، توجه مراکز علمی دنیا به تولید واکسن ضد ویروس پاپیلومای انسانی افزایش یافته است [۳۰]. با توجه به وفور نسبتاً بالای ویروس در بافت‌های مبتلا به سرطان، می‌توان در آینده از واکسن ضد ویروس در جمعیت پرخطر استفاده کرد. هم‌چنین انواعی از داروهای اینترفرون در درمان ضایعات مرتبط با عفونت ویروس پاپیلومای انسانی استفاده می‌شود [۳۰]. لازمه استفاده از این درمان، تشخیص وجود عفونت در بافت‌های مبتلاست؛ لذا به نظر می‌رسد که انجام آزمایش‌های مولکولی به همراه سایر بررسی‌ها در ضایعات پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم و حتی اسمیرهای سرویکواژینال (پاپ اسمیر) که مشکوک به عفونت ویروس پاپیلومای انسانی هستند، ضروری است. در مطالعه حاضر ۳۱/۶٪ از بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم ویروس پاپیلومای انسانی مثبت بودند. از آنجایی 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. امروزه برای درمان سرطان دهانه رحم در اغلب اوقات برداشتن بافت رحم، شیمی درمانی، پرتودرمانی و هورمون درمانی استفاده می‌شود.

### سپاسگزاری

در اینجا لازم است از تمامی کارکنان و ریاست محترم موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی کرج به خاطر مساعدت‌هایشان تشکر و قدردانی نماییم.

### References

1. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001;2(9):533-43. doi: 10.1016/S1470-2045(01)00486-7 pmid: 11905707
2. Longnecker MP, Bernstein L, Paganini-Hill A, Enger SM, Ross RK. Risk factors for in situ breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5(12):961-5. pmid: 8959317
3. Peedicayil A, Abraham P, Sathish N, John S, Shah K, Sridharan G, et al. Human papillomavirus genotypes associated with cervical neoplasia in India. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(4):1591-5. doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00631.x pmid: 16884371
4. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):1-17. pmid: 12525422
5. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ.* 2001;164(7):1017-25. pmid: 11314432
6. Baliga MS, Dsouza JJ. Amla (*Embliba officinalis* Gaertn), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. *Eur J Cancer Prev.*

زنان استرالیایی مشاهده نمودند. از مجموع ۵۰ نمونه، ۲۴ مورد (۴۸٪) برای ویروس پاپیلومای انسانی مثبت بودند [۳۲]. Vidal و همکاران در سال ۲۰۱۱ توزیع ژنوتیپ ویروس پاپیلومای انسانی در داخل اپیتلیال و سرطان گردن رحم در زنان تانزانیا را بررسی کردند. سیتولوژی دهانه رحم و تست ویروس پاپیلومای انسانی در میان ۲۱۵ نفر از زنان تانزانیایی شمالی انجام گرفت که ۵۵٪ از قبایل Chaga و ۳۰٪ از قبایل دیگر بودند و سن متوسط آن‌ها ۴۴/۷ و ۵۵/۲ به ترتیب بود. ویروس پاپیلومای انسانی در ۶۷٪ از CIN تشخیص داده شد و ۵۰٪ از ویروس پاپیلومای انسانی شناسایی شده ژنوتیپ‌های high-risk HPV (hrHPV) بودند. انواع پر خطر ویروس پاپیلومای انسانی به عنوان عفونت در یک یا چند مورد در ۷۸٪ از موارد ICC یافت شد [۳۳]. مطالعات اپیدمیولوژیکی در ۲۲ کشور نشان داد که hrHPV (high-risk HPV) می‌تواند در ۹۹/۷٪ موارد مشخص سرطان دهانه رحم وجود داشته باشد. hrHPV در حدود ۹۰٪ از ضایعات دهانه رحم در ایالات متحده آمریکا مثبت گزارش شد [۳۴]. نیاکان و همکاران در سال ۱۳۷۹ ویروس پاپیلومای انسانی در ضایعات سرطان دهانه رحم با روش هیبریداسیون مولکولی را بررسی کردند. در این تحقیق تنوع تیپ‌های ویروس پاپیلومای انسانی با استفاده از روش هیبریداسیون مولکولی تعیین گردید. تکنیک (ISH: Insitu Hybridization) با مواد و پروب‌های نشاندار شده با بیوتین انجام گردید. این یافته‌ها نشان داد که مطالعات مولکولی در شناسایی ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی امکان پذیر بوده و از سرطان‌های دهانه رحم زنان ایرانی ویروس ۱۶ HPV و ۱۸ HPV جدا می‌گردد [۳۵]. در سرطان دهانه رحم به علت در دسترس بودن بافت مربوطه، اثرات پیش‌گیری، تشخیص زودرس و درمان به موقع بر کاهش میزان مرگ و میر 2011;20(3):225-39. doi: 10.1097/CEJ.0b013e32834473f4 pmid: 21317655

7. Czegledy J, Gergely L, Hernadi Z, Poka R. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in the female genital tract. *Med Microbiol Immunol.* 1989;178(6):309-14. pmid: 2559306
8. Malloy C, Sherris J, Herdman C. HPV DNA Testing: Technical and Programmatic Issues for Cervical Cancer Prevention in Low-Resource Settings. 2000.
9. Ritter DB, Kadish AS, Vermund SH, Romney SL, Villari D, Burk RD. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in exfoliated cervicovaginal cells as a predictor of cervical neoplasia in a high-risk population. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159(6):1517-25. pmid: 2849881
10. Singh A, Datta P, Jain SK, Bhatla N, Dutta Gupta S, 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. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;19(9):1642-8. doi: 10.1111/IGC.0b013e3181a83555 pmid: 19955952

11. 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. *Indian J Med Res.* 2009;130(3):222-33. [pmid: 19901431](#)
12. Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer.* 1999;80(12):2008-18. [doi: 10.1038/sj.bjc.6690635](#) [pmid: 10471054](#)
13. Zanotti KM, Kennedy AW. Screening for gynecologic cancer. *Med Clin North Am.* 1999;83(6):1467-87. [pmid: 10584603](#)
14. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2013;382(9895):889-99. [doi: 10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](#) [pmid: 23618600](#)
15. Konidaris S, Kouskouni EE, Panoskaltsis T, Kreatsas G, Patsouris ES, Sarivalassis A, et al. Human papillomavirus infection in malignant and benign gynaecological conditions: a study in Greek women. *Health Care Women Int.* 2007;28(2):182-91. [doi: 10.1080/07399330601128627](#) [pmid: 17364979](#)
16. Schiffman MH, Castle P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(6):E2. [pmid: 12644550](#)
17. Li S, Meng YH, Ting H, Shen J, Ma D. Clinical significance of human papilloma virus infection in the cervical lesions. *Front Med China.* 2010;4(3):264-70. [doi: 10.1007/s11684-010-0094-6](#) [pmid: 21191829](#)
18. Bazuaye PE. Cervical dysplasia in Jamaica women: lifestyle and genetic factors: The University of the West Indies; 2012.
19. Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003(31):29-34. [pmid: 12807942](#)
20. Mostafavizadeh SM, Niakan M, Ahmadi A, Aghabozorgi S, Lak R, Piroozmand A. Frequency distribution of HPV18 based on the detection of E6 oncoprotein gene in cervix cancer samples. *Feyz J Kashan Univ Med Sci.* 2013;17(3).
21. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(11):796-802. [pmid: 7791229](#)
22. Sifuentes Alvarez A, Reyes Romero M. [Risk factors for cervico-uterine cancer associated to HPV: p53 codon 72 polymorphism in women attending hospital care]. *Ginecol Obstet Mex.* 2003;71:12-5. [pmid: 12708345](#)
23. Hamkar R, Azad TM, Mahmoodi M, Seyedirashti S, Severini A, Nategh R. Prevalence of human papillomavirus in Mazandaran Province, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J.* 2002;8(6):805-11. [pmid: 15568458](#)
24. Nasiri S, Ghalamkarpoor F, Saberi A, Vesal P. [Study of human papilloma virus in anogenital condylomas by PCR method]. *Arch Clin Infect Dis.* 2008;3(1).
25. Park JS, Namkoong SE, Lee JM, Kim EJ, Chee YH, Han GT, et al. Cervical intraepithelial neoplasia 3, coinfecting with HPV-16 and -18--case report. *J Korean Med Sci.* 1993;8(2):162-5. [doi: 10.3346/jkms.1993.8.2.162](#) [pmid: 8397933](#)
26. Johnson R. *Viral infections of the nervous system*: Lippincott-Raven Publishers; 1998.
27. Schiller JT, Hidesheim A. Developing HPV virus-like particle vaccines to prevent cervical cancer: a progress report. *J Clin Virol.* 2000;19(1-2):67-74. [pmid: 11091149](#)
28. Meshkat Z, Soleimanjahi H, Mahmoudi M, Mirshahabi H, Hassan ZM, Ghaffari SR, et al. Determination of human papillomavirus type 16 genotype and construction of cloning vector pTZ57R encoding HPV16 E7 gene. *Saudi Med J.* 2007;28(10):1511-5. [pmid: 17914510](#)
29. Stamenkovic M, Knezevic A, Knezevic I, Kuzmanovic I, Karalic D, Milenkovic S, et al. High-risk human papilloma virus genotypes in cervical carcinoma of Serbian women: Distribution and association with pathohistological findings. *Biologicals.* 2016;44(5):412-6. [doi: 10.1016/j.biologicals.2016.05.001](#) [pmid: 27461126](#)
30. Keyhani E, Kohannia N, Izadimood N, Keykhakeh M, Najmabadi H. The prevalence of human papilloma virus (HPV) in malignant cervical lesion, using multiplex PCR. *Tehran Univ Med J TUMS Publ.* 2006;64(3):95-101.
31. Jabbar Poor M. Determination of various types of human papillomavirus enucleation in cervical cancer lesions in north west of Iran. *Q Tropic Dis J.* 2007;13(41):29-34.
32. Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br J Cancer.* 2005;93(8):946-8. [doi: 10.1038/sj.bjc.6602778](#) [pmid: 16222323](#)
33. Vidal AC, Murphy SK, Hernandez BY, Vasquez B, Bartlett JA, Onoko O, et al. Distribution of HPV genotypes in cervical intraepithelial lesions and cervical cancer in Tanzanian women. *Infect Agent Cancer.* 2011;6(1):20. [doi: 10.1186/1750-9378-6-20](#) [pmid: 22081870](#)
34. Xu QX, Zhang ZY. High-risk human papillomavirus genotypes in cervical lesions and vaccination challenges in China. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2193-7. [pmid: 25824736](#)
35. Niakan M. [Human papillomavirus diagnosis in cervical cancer lesions by molecular hybridization]. *Q J Fertil Infertil.* 1998;8(2):18-22.
36. McNair R, Power J, Carr S. Comparing knowledge and perceived risk related to the human papilloma virus among Australian women of diverse sexual orientations. *Aust N Z J Public Health.* 2009;33(1):87-93. [doi: 10.1111/j.1753-6405.2009.00345.x](#) [pmid: 19236366](#)