تعیین انواع انکوژن ویروس پاپیلومای انسانی به روش PCR چندگانه در ضایعات سرطانی دهانه رحم در منطقه شمال غرب ایران

مرتضی جبارپور بنیادی[۱*]، محسن اسماعیلی[۲]، علی دسترنج[۳]

۱. PhD ژنتیک پزشکی مولکولی، استادیار دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز و پژوهشگر مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۲. MSc ژنتیک انسانی، پژوهشگر آزمایشگاه ژنتیک مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۳. PhD پاتولوژی، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

* **نشانی برای مکاتبه:** تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست‌شناسی جانوری تلفن:۳۳۹۲۶۷۳-۰۴۱۱ ، نمابر ۳۳۵۶۰۲۷-۰۴۱۱ همراه: ۰۹۱۴۳۱۳۹۸۲۵ - jabbarpour@tabrizu.ac.ir

دریافت مقاله: آبان هشتاد و شش **پذیرش برای چاپ: دی هشتاد و شش**

چکیده

سابقه و هدف: *انواع پر خطر ویروس پاپیلومای انسانی نقش اصلی در ایجاد سرطان سرویکس دارند. بنابراین تشخیص دقیق آنها تاثیر قابل ملاحظه‌ای در امر کنترل و مدیریت این سرطان و ارتقاء سلامت زنان جامعه خواهد گذاشت. هدف این مطالعه تعیین چهار تیپ شایع انکوژن از این ویروس در نمونه های بافتی بایگانی شده که به لحاظ پاتولوژیک دارای ضایعات سرطانی سرویکس تشخیص داده شده‌اند، میباشد.*

روش کار: *۷۵ نمونه تثبیت شده در فرمالین و محصور در پارافین از نظر وجود DNA چهار تیپ شایع ویروس HPV (تیپهای ۱۶، ۱۸، ۳۱ و ۳۳) با استفاده از دو سری PCR اختصاصی تحت آزمون قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *۴۶ نمونه (۶۲٪) از ۷۲ نمونه مناسب، از نظر حضور DNA ویروس HPV مثبت بودند. شایعترین تیپ HPV مشاهده شده در نمونه ها، تیپ ۱۶ با فراوانی ۶۴/۵٪ بوده که پس از آن به ترتیب تیپهای ۳۱ ، ۱۸ و ۳۳ با فراوانی های ۲۲/۶ ، ۱۱/۳ و ۱/۶ درصد در بین نمونه های مثبت دیده شدند. عفونت همزمان با انواع تیپها در ۱۵ (۲۰٪) نمونه مشاهده گردید.*

نتیجه‌گیری: *حضور عفونت همزمان و چندگانه با برخی از انواع HPV و نیز شیوع نسبتاً متفاوت برخی از انواع این ویروس در جمعیت مورد مطالعه، میتواند راهگشای برنامه‌ریزیهای آینده جهت غربالگری و مدیریت این بیماری مهم و در آینده ای نه چندان دور، واکسیناسیون بر علیه تیپهای شایع باشد.*

واژگان کلیدی: ***ویروس پاپیلومای انسانی، سرطان سرویکس، PCR، زنان، شمال‌غرب ایران***

مقدمه

سرطان سرویکس دومین سرطان شایع زنان در جهان بوده و نقش ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) در سبب شناسی آن کاملا اثبات شده است(۱و۲). نحوه انتقال این ویروس به طریقه جنسی بوده و با وجود اینکه بیش از ۲۰۰ تیپ مختلف برای آن شناسایی شده است، لیکن مطالعات اپیدمیولوژیک و مولکولی نشان داده‌اند که تنها ۱۵ تیپ (تیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۸، ۷۳ و ۸۲) از آن، که به تیپ‌های پرخطر معروف هستند، سرطان‌زا می‌باشند (۳). با این وجود عوامل مستعدکننده دیگری از قبیل داشتن شرکای جنسی متعدد، وجود نقص سیستم ایمنی، مصرف قرص‌های ضدبارداری و سیگار نیز برای بروز این سرطان مطرح می‌باشند(۴و۵).

خوشبختانه اکثر تغییرات القائی توسط این ویروس گذرا بوده و حدود ۹۰ درصد این عفونت‌ها در عرض ۱۲ الی ۳۶ ماه و در اثر فعالیت سیستم ایمنی خودبخود بهبود می‌یابند و تنها در ۱۰ درصد از زنانی که عفونت آنها به شکل دائمی درمی‌آید، ضایعات پیش‌سرطانی و سپس سرطانی ایجاد می‌شود(۴). اما بنظر می‌رسد میزان ابتلا به سرطان سرویکس در کشورهای درحال توسعه، به علت به اجرا گذاشتن نشدن برنامه‌های غربالگری موثری، بتدریج رو به افزایش باشد(۶). با مشخص شدن اینکه تیپ های پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی عامل اصلی سرطان سرویکس بوده و تعیین بموقع و درمان سریع این عفونت‌ها می‌تواند از پیشرفت ضایعات ایجاد شده به حالت سرطانی شدن ممانعت و جلوگیری نماید، میتوان به راحتی به اهمیت و ضرورت جایگاه تشخیص این گونه عفونت ها در برنامه‌های غربالگری و اقدامات معمول بالینی پی برد (۱۰-۷).

اگرچه در مورد بکارگیری تشخیص HPV در غربالگری‌های اولیه سرطان دهانه گردن رحم هنوز بحث وجود دارد، لیکن امروزه الگوریتم و برنامه‌های جدیدی مبتنی بر غربالگری اولیه این ویروس آغاز و به اجرا درآمده است چراکه آزمایش معمول و قدیمی پاپ اسمیر علاوه بر محدودیت‌های متعدد، از لحاظ حساسیت تشخیصی نیز نسبت به روش تشخیص مولکولی HPV از جایگاه پایینتری برخوردار است (۱۲، ۱۱ ، ۸ ، ۴). تست‌های تشخیصی HPV متداول بر ردیابی DNA طیف وسیعی از انواع تیپ‌های HPV در یک آزمایش منفرد متکی هستند(۱۳). روش‌های متعددی برای نیل به این هدف توسعه یافته‌اند که از جمله میتوان روش‌های Hybrid Capture II و PCR مبتنی بر توالی‌های حفظ شده اشاره نمود. اما چون فقط تیپ های پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی باعث سرطان سرویکس می‌شوند ضروری است که نوع تیپ‌های HPV در نمونه‌های سرطانی تعیین گردند(۱۴). روش‌های مختلفی نظیر RFLP ، هیبریداسیون معکوس و تعیین توالی مستقیم جهت تعیین ژنوتیپ‌های این ویروس به کار برده شده‌اند (۱۵). اما روش نسبتا ساده و اقتصادی جهت تعیین تیپ‌های HPV استفاده از PCR اختصاصی برای هر تیپ است(۱۹-۱۴). اگرچه تیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱ و ۳۳ بعنوان شایع‌ترین تیپ‌های سرطان‌زا در جهان معرفی شده‌اند لیکن این تیپ‌ها همیشه شایع‌ترین تیپ‌ها گزارش نشده‌اند(۲۲-۲۰، ۱۴). بر این اساس ضروری بنظر می‌رسد که شایع‌ترین تیپ‌های HPV در هر جمعیت بصوت جداگانه تعیین گردیده تا بتوان از آنها برای طراحی یک برنامه غربال‌گری موثر ، مدیریت بیماری و در نهایت واکسیناسیون جمعیت هدف برعلیه تیپ‌های ویروسی شایع در همان جمعیت استفاده کرد. در نیل به این هدف، تیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱ و ۳۳ در ضایعات سرطانی دهانه رحم در بین مبتلایان معرفی شده از منطقه شمال غرب با استفاده از تکنیک PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

۷۵ نمونه بافتی فیکس شده در فرمالین و محصور در پارافین از بیماران دارای ضایعات سرطانی دهانه گردن رحم از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستانهای الزهرا و طالقانی (بین سال‌های ۱۳۸۵-۱۳۸۰) جمع‌آوری گردید. همچنین از ۸ نمونه از ضایعات خوش خیم مجاری تناسلی زنان نیز بعنوان کنترل منفی آزمایشات استفاده شد.برای استخراج DNA حدود ۸-۵ برش پشت سرهم با ضخامت ۲۰ میکرون توسط دستگاه میکروتوم و با استفاده از تیغهای یکبار مصرف برای هر نمونه بلوک FFPE صورت پذیرفته و در میکروتیوبهای ml ۱/۵ استریل جمع آوری گردید. دور ریختن برشهای اولیه از هر بلوک جهت حذف هر نوع آلودگی احتمالی ضروری است. همچنین بصورت تصادفی در بین برش نمونه‌های مورددار، نمونه‌های کنترل منفی نیز برش داده می شدند تا از لحاظ هرگونه احتمال آلودگی نیز بررسی شوند. سپس DNA هر نمونه با روش Cao و همکاران(۲۳) استخراج گشته و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد.تمامی نمونه‌ها تحت دو سری PCR مولتی‌پلکس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر تیپ قرار گرفتند. در PCR سری اول تیپهای ۱۶ و ۱۸ بر اساس پرایمرها و شرایط مطالعه Samaylova و همکاران، مورد ارزیابی قرار گرفتند(۲۴). الکتروفورز در ژل آگاروز ۲/۵٪ و یا پلی آکریل آمید ۱۰٪ و سپس رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید جهت بررسی قطعات تکثیریافته بکار برده شد. در PCR سری دوم تیپهای ۳۱ و ۳۳ براساس پرایمرهای جدید و نیز شرایط ذکر شده در مقاله Baay و همکاران تحت آزمایش قرار گرفتند (۱۷). تنها تغییری که در این روش داده شد این بود که جهت افتراق بین دو تیپ از الکتروفورز بر روی ژل آکریل آمید ۱۰٪ (۱۰۰ ولت ، ۵ ساعت) استفاده شد تا امکان افتراق بین باندهای ۱۱۰ جفت باز مربوط به تیپ ۳۱ از باندهای ۱۱۷ جفت باز تیپ ۳۳ میسر گردد. رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و یا نیترات نقره جهت بررسی ژل بکار برده شد.

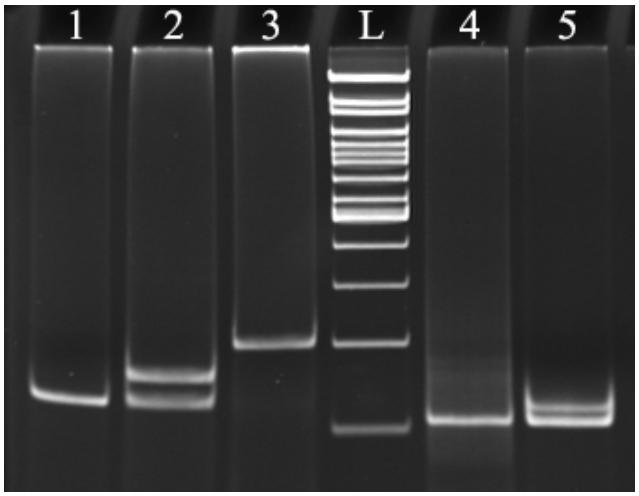
جهت ارزیابی کیفیت DNA در نمونه‌هایی که از لحاظ PCR اختصاصی تیپ منفی بودند، از PCR با پرایمرهای ژن کانکسین ۲۶ (ست نرمال 35delG) استفاده شد (۲۵). استفاده همزمان از نمونه های کنترل منفی و نیز آب مقطر در هر سری از واکنشهای PCR جهت بررسی صحت آزمایشات از لحاظ هرگونه آلودگی احتمالی با DNA ویروس بکار برده شد.

یافته‌ها

جدول ۱ مشخصات نمونه‌های جمع‌آوری شده بهمراه نتایج PCR اختصاصی تیپ ها را به تفکیک برای هر دسته نشان میدهد. تنها یک نمونه بدلیل اینکه DNA مناسب نداشته و با پرایمرهای کانکسین ۲۶ بعنوان کنترل قابلیت جوابدهی با PCR را نداشت از مطالعه و آنالیز داده‌ها خارج شد. از بین ۷۴ نمونه مناسب، ۴۶ نمونه (۶۲٪) برای چهار تیپ انکوژن مثبت بودند (جدول ۱). در بین ۴۶ نمونه مثبت، شایعترین تیپ درگیر تیپ ۱۶ (۶۴/۵٪) بود. سایر تیپ ها به ترتیب فراوانی شامل تیپ ۱۸، ۱۱/۳٪ ، تیپ ۳۱ ، ۲۲/۶٪ و تیپ ۳۳ ، ۱/۶٪ بود. عفونت چندگانه در ۱۵ نمونه (۲۰٪) مشاهده گردید. از بین این ۱۵ نمونه، ۱۴ نمونه عفونت دوتایی داشته و شایعترین آنها عفونت توامان با تیپهای ۱۶/۳۱ بود. در اکثریتموارد(۱۲ مورد) نمونه‌های دارای عفونت دوتایی، تیپ ۱۶ وجود داشت. یک مورد عفونت سه تایی نیز با تیپ های ۱۶/۳۱/۳۳ دیده شد. هیچکدام از نمونه‌های کنترل منفی برای DNA ویروس مثبت نبودند. محصولات تکثیریافته از این PCR در شکل (۱) مشاهده می-شود.

جدول ۱. شیوع تیپ های مختلف HPV در بین نمونه‌های سرطانی دهانه گردن رحم (به عدد)

یافته پاتولوژی	تیپهای HPV							
	۱۶	۱۸	۳۱	۱۶/۱۸	۱۶/۳۱	۱۶/۳۱/۳۳	۱۸/۳۱	منفی	مجموع
Squamous Cell Carcinoma (SCC)	۲۴	۲	۲	۳	۹	۰	۲	۲۳	۶۵
Adenocarcinoma	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳	۵
In situ Carcinoma	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۲	۴



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آکریل آمید ۱۰٪ . شماره ۱ یک case مثبت برای تیپ ۱۶ بوده (باندbp۱۲۰) و شماره ۲ بیماری با عفونت همزمان برای تیپهای ۱۶ و ۱۸ (با طول باند bp۱۴۰) را نشان میدهد. شماره ۳ محصول PCR یک نمونه برای قطعه bp۲۰۲ ژن کانکسین ۲۶ میباشد. شماره‌های ۴ و ۵ به ترتیب نشاندهنده موارد مثبت برای تنها تیپ ۳۱ و برای هر دوتیپ ۳۱ و ۳۳ است. در این شکل L مارکر وزن مولکولی bp۱۰۰ می‌باشد.

بحث

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که برخی از انواع HPV که به تیپهای پرخطر معروفند، نقش مهمی در ایجاد سرطان سرویکس دارند بطوریکه این تیپها در بیش از ۹۹٪ سرطانهای سرویکس در جهان شناسایی شده‌اند (۲۰، ۱۴، ۵). ولی متاسفانه آمار جامعی در مورد شیوع انواع انکوژن این ویروس در رابطه با سرطان گردن رحم در ایران وجود ندارد.

محدودیتهای سیتولوژیکی (Pap-test) در پیشگویی سرطانهای سرویکس منجر به این شد که روشهای حساستر تعیین HPV همچون روشهای مبتنی بر PCR توسعه یافتند (۲۶). لیکن با توجه به مشکلات آزمونهای عمومی تشخیص طیف وسیع HPV ، در تشخیص کمتر از حد (undediagnosis) این ویروس (بدلیل از بین رفتن ناحیه هدف مورد PCR عمومی طی فرآیند ادغام ژنوم ویروس به درون ژنوم میزبان) (۱۴) و نیز سرطان زایی انواع پرخطر ویروس ، افتراق انواع انکوژن این ویروس ضروری بنظر میرسد. همچنین از بین انواع روشهای مختلف تعیین تیپهای انکوژن ، انتخاب پرایمرهای مناسب با توجه به ماهیت بافتهای مورد بررسی، جهت پیشگیری از بروز خطای دوم تشخیص کمتر از حد نیز امری بدیهی است (۱۶). بطوریکه مطالعات مختلف بر روی نمونه‌های FFPE ثابت کردند که کارآیی یک جفت پرایمر بطور معکوسی به طول قطعه تکثیر یافته بستگی داشته و پرایمرهای دارای محصولات کوچکتر از ۲۰۰bp برای این امر مناسب می‌باشند. این امر به دلیل نقش آنتاگونیستی تثبیت فرمالدئید میباشد که باعث خرد شدن قطعات DNA شده و امکان تکثیر قطعات بزرگتر از ۲۰۰bp را با مشکل مواجه میسازد (۲۹-۲۷). بهمین دلیل در این مطالعه از پرایمرهایی با محصولات کمتر و یا حدود ۲۰۰bp استفاده شده است (شکل ۱).

در این مطالعه میزان عفونت با چهار تیپ انکوژن در بین بیماران دارای ضایعات سرطانی دهانه گردن رحم از شمال غرب ایران ۶۲٪ میباشد. این میزان عفونت با نتایج مطالعات دیگر از نواحی متفاوتی از ایران و نیز سایر کشورها مطابقت دارد (۳۵-۳۰) (جدول ۲). شیوع بالای تیپ ۱۶ با نتایج مطالعات جهانی مطابقت دارد (۳۶). همچنین این تیپ شایعترین تیپ گزارش شده در بین نمونه‌های سرطانی بیماران مازندران و یزد می-باشد(۳۳ ، ۳۰). نتایج این مطالعه احتمالا اولین گزارشی از ایران می‌باشد که در آن شیوع تیپ ۳۱ در بین نمونه های آلوده به HPV بیشتر از تیپ ۱۸ میباشد (۳۳>۱۸>۳۱>۱۶). این نتایج میتواند این فرضیه را تقویت کند که فراوانی تیپ های در گردش یک جمعیت میتواند متفاوت از سایر جوامع باشد.

عفونتهای چندگانه نیز در جدول (۱) به وضوح مشاهده می‌گردد. میزان عفونتهای منفرد و چندگانه به ترتیب ۴۲ و ۲۰ درصد میباشد. این نتایج میتواند در توسعه استراتژی درمانی جهت هدف قرار دادن همزمان انواع ویژه و چندگانه این ویروس مورد استفاده قرار گیرد (۳۷).

برخی نمونه ها دارای محصولات ضعیف تر از سایر موارد بودند. اگرچه آزمایشات این مطالعه بصورت کمی انجام نپذیرفته، لیکن این امر میتواند نشانگر مقدار کم ویروس در آن نمونه ها باشد. مقدار کم ویروس میتواند از نظر پیشگویی پیشرفت تومور مهم و مفید باشد(۱۶)، که مستلزم بررسی بیشتر توسط تکنیکهای کمّی و حساس دیگر میباشد.

در این مطالعه حدود ۳۸ درصد از نمونه‌ها از نظر چهار تیپ منفی بودند که این امر میتواند بدلیل احتمال دخالت سایر تیپ های انکوژن در سرطان زایی نمونه‌های مورد مطالعه بوده و لزوم مطالعه سایر تیپ های ناشناخته در این موارد در آینده ضروری بنظر میرسد.

از آنجایی که نمونه های بررسی شده در این مطالعه از یکی از مهمترین مراکز رفرانس شمال غرب ایران جمع آوری شده بود، نتایج بدست آمده میتواند اهمیت غربالگری و مدیریت این بیماری منتقل یافته از راه جنسی در این ناحیه را که در آن میزان بالای رفت و آمد مرزی وجود دارد، بیش از پیش نشان دهد.

جدول ۲. مقایسه فراوانی چهار تیپ انکوژن HPV در جمعیتهای مختلف ایران (به درصد)[1]

کشور	تیپ ۱۶	تیپ ۱۸	تیپ ۳۱	تیپ ۳۳	مجموع
شمال (مازندران) {فقط نمونه‌های Cancerous لحاظ شده است}	۴۴/۵	۲۹/۵	۱۵	۱۱	۶۴/۳
جنوب (شیراز)	۱۰۰	۰	تعیین نشده	تعیین نشده	۲۲/۸
مرکز (تهران) {فقط نمونه های SCC لحاظ شده است}	۵۰		۵۰		۴۶/۷
جنوب (یزد)	۷۷/۸	۱۸/۵	۰	۳/۷	۶۷/۵
شمالغرب (تبریز)	۶۴/۵	۱۱/۳	۲۲/۶	۱/۶	۶۲

۱. فراوانی تیپ های مختلف در بین نمونه‌های مثبت از نظر تایپینگ محاسبه شده و فراوانی مجموع حاصل از تقسیم کل نمونه‌های مثبت از نظر چهار تیپ بر کل نمونه‌های مورد مطالعه میباشد (و نمونه های مثبت از نظر آزمون جنرال وارد نشده است)

تشکر و قدردانی

مولفین از پرسنل آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان الزهرا، کمال تشکر و قدردانی را دارند. هزینه این طرح توسط واحد تحقیقات توسعه بیمارستان الزهرا (معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز) تامین شده است.

REFERENCES

1. Parkin DM, Stjernsward J, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. Bull WHO 1984; 62:163-182.

2. Zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol 1994; 186:131-56.

3. Munoz N, Bosch FX, De Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348:518-27.

4. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev 2003; 16:1-17.

5. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. CMAJ 2001; 164:1017-25.

6. Parkin DM: Global cancer statistics in the year 2000. Lancet Oncol 2001; 2:533-543.

7. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, and Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 2002; 55:244-265.

8. Sasieni P, Cuzick J. Could HPV testing become the sole primary cervical screening test? J Med Screen 2002; 9:49-51.

9. Spitzer M. Cervical screening adjuncts: recent advances. Am J Obstet Gynecol 1998; 179:544-556.

10. Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. J Pathol 2002; 201:1-6.

11. Cuzick J. Role of HPV testing in clinical practice. Virus Research 2002; 89:263-269.

12. Franco EL. Chapter 13: Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003; 31:89-96.

13. Snijders PJF, van den Brule AJC, Jacobs MV, Pol RP, Meijer CJLM. HPV DNA detection and typing in cervical scrapes. In: METHODS IN MOLECULAR MEDICINE. 1st ed. London: Humana press. 2005; pp:101-102.

14. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1999; 189:12-19.

15. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. J Clin Virol 2005; 32S:S43-S51.

16. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. J Clin Microbiol 1996; 34:2095-100.

17. Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. J Clin Microbiol 1996; 34:745-7.

18. Nobbenhuis MA, Meijer CJ, van den Brule, AJ, Rozendaal L, Voorhost FJ, Risse EK et al. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. Br J Cancer 2001; 84:796-801.

19. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N et al. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. J Clin Microbiol 2004; 42:3176-84.

20. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. Obstet Gynecol 1992; 79:328-337.

21. Higgins GD, Davy M, Roder D, Uzelin DM, Phillips GE, Burrell CJ. Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA. Lancet. 1991; 338:910-3.

22. Castellsague X, Menendez C, Loscertales MP, Kornegay JR, dos Santos F, Gomez-Olive FX et al. Human papillomavirus genotypes in rural Mozambique. Lancet 2001; 358:1429-1430.

23. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. Cancer Detect Prev 2003; 27:397-404.

24. Samoylova EV, Shaikhaiev GO, Petrov SV, Kisseljova NP, Kisseljov FL. HPV infection in cervical cancer cases in Russia. Int J Cancer 1995; 61:337-341.

25. Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. Hum Mut 1998; 11:387-394.

26. Mobius G. Cytological early detection of cervical carcinoma: possibilities and limitations, analysis of failures. J Cancer Res Clin Oncol 1993; 119:513-21.

27. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. J Histochem Cytochem 1991; 39:351-354.

28. Thompson CH, Rose BR. Deleterious effects of formalin/acetic acid/alcohol (FAA) fixation on the detection of HPV DNA by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. Pathology 1991; 23:327-330.

29. Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. Lab Invest 1994; 71:604-611.

30. Hamkar R, Mokhtari Azad T, 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).

31. Farjadian S, Asadi E, Doroudchi M, Samsami Dehaghani A, Tabei SZ, Kumar VP et al. High risk HPV types in southern Iranian patients with cervical cancer. Pathol Oncol Res 2003; 9:121-125.

۳۲. نیاکان محمد، گرشاسبی احیا، جلالی محمدرضا، گیلانی مدرس، فقیه زاده سقراط. تشخیص ویروس پاپیلومای انسان (HPV) در ضایعات سرطان سرویکس با روش هیبریدیزاسیون ملکولی. فصلنامه باروری و ناباروری تابستان ۱۳۷۹، سال اول: شماره ۳ صفحات ۱۸ تا ۲۲ .

۳۳. محمودی سیدمحمدمهدی, همکار رسول, اخوان تفتی محمود, اسلامی فر علی, ادیبی لادن, صدرآبادی سیدعلی اصغر و همکاران. ژنوتیپهای پاپیلوماویروس انسانی در نمونه های سرطانی دهانه رحم در استان یزد. فصلنامه بیماریهای عفونی و گرمسیری ایران تابستان ۱۳۸۶ ، سال دوازدهم: شماره ۳۷ صفحات ۱۹ تا ۲۴ .

34. Cavalcanti SM, Zardo LG, Passos MR, Oliveira LH. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. J Infect 2000; 40:80-7.

35. Guney AI, Inche U, Kullu S, Pekin S, Cirakoglu B. Detection and typing of human papillomavirus in cervical specimens of Turkish women. Eur J Gynaecol Oncol 1997; 18:546-50.

36. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. Int J Cancer 2007; 121:621-632.

37. Huang LW, Chao SL, Chen PH, Chou HP. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. J Clin Virol. 2004; 29:271-6.