Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Relative Frequency of *Human papillomavirus* Genotypes and its Related Characteristics in Women Referred to Alzahra Hospital in Tabriz

Behzad Jamali[1], **Sajjad Jamali**[2]

1. Young Researchers and Elite Club, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Department of Laboratory Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2017/10/28
Accepted: 2018/02/13
Available online: 2018/05/14

Article Subject:
Medical Virology

IJMM 2018; 12(1): 51-60

Corresponding author:

Behzad Jamali
Young Researchers and Elite Club, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Tel: 09145179328

Email:
behzad.jamali@ yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Human papillomavirus (HPV) is one of the major public health problems and the main causes of cervical cancer. The prevalence HPV infection in developing countries with low financial resources is high. This study aimed to determine the relative frequency of HPV genotypes and its sociodemographic characteristics in women referred to a general hospital in Tabriz, Iran from 2015-2016.

Materials and Methods: This cross-sectional study was performed in 400 women with Pap smear samples, referring to to a general hospital in Tabriz, Iran from 2015- 2016. The detection of 28 HPV genotypes was performed by using the PCR technique. The sociodemographic survey was conducted for each HPV positive woman.

Results: HPV-positive infection was detected in 155 (38.75%) women aged 17-85 years. HPV 16 (19.1%) was the most prevalent type, followed by HPV 39 (12.5%) and HPV 18 (8.9%). The highest rate of HPV infection was observed at the age of 36 years (7.7%). The level of education and economic situation of each woman were showed most of HPV-positive women had a high school diploma (34.6%) and average economic situation (67,9%). 60.9% of these women were a housewife, and 67.3% lived in the capital .

Conclusions: Determination of HPV genotype and risk factor related to HPV infection in each geographical region can lead to the production of effective vaccines against the HPV virus. It can also be useful for disease management and high sensitivity diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia.

Keywords: *Epidemiology , genotypes , papillomaviridae, Cervical Cancer*

Fabrication - Retracted

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Jamali B, Jamali S. Relative Frequency of *Human-papillomavirus* Genotypes and its Related Characteristics in Women Referred to Alzahra Hospital in Tabriz. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (1): 51-60

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۱ – فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

فراوانی نسبی ژنوتیپ‌های ویروس پاپیلومای انسانی و خصوصیات مرتبط با آن در زنان مراجعه کننده به بیمارستان الزهرای تبریز

بهزاد جمالی[۱]، سجاد جمالی[۲]

۱. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۲. گروه علوم آزمایشگاهی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۶

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴

موضوع:

ویروس‌شناسی پزشکی

IJMM1397;12(1): 51-60

نویسنده مسئول:

بهزاد جمالی

باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تلفن: ۰۹۱۴۵۱۷۹۳۲۸

پست الکترونیک:

behzad.jamali@ yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: ویروس پاپیلوم انسانی (*HPV*) یکی از مهمترین مشکلات بهداشت عمومی و عامل اصلی سرطان دهانهٔ رحم است. عفونت *HPV* در کشورهای در حال توسعه با منابع مالی کم، شیوع زیادی دارد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی نسبی ژنوتیپ‌های *HPV* و خصوصیات مرتبط با آن در زنان مراجعه کننده به یکی از بیمارستان‌های عمومی شهر تبریز انجام شده است.

مواد و روش کار: این مطالعهٔ مقطعی روی ۴۰۰ زن با نمونهٔ پاپ اسمیر، مراجعه‌کننده به یک بیمارستان عمومی در تبریز از شهریور ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۵ انجام شد. شناسایی ژنوتیپ ۲۸ ویروس پاپیلومای انسانی(*HPV*) با استفاده از روش PCR انجام شد.

یافته‌ها: عفونت *HPV* مثبت در ۱۵۵ زن (۳۸/۷۵٪) در محدودهٔ سنی۱۷ تا ۸۵ سالگی تشخیص داده شد. شایع‌ترین نوع، *HPV*-۱۶ (۱۹/۱٪) بود که به دنبال آن *HPV*-۳۹ (۱۲/۵٪) و *HPV*-۱۸ (۸/۹٪) بود. بالاترین میزان عفونت *HPV* در سن ۳۶ سالگی (۷/۷٪) مشاهده شد. سطح تحصیلات و وضعیت اقتصادی هر زن نشان داد که بیشترِ زنان مبتلا به *HPV* دیپلم (۳۴/۶٪) داشته و وضعیت اقتصادی متوسطی (۶۷/۹٪) دارند. ۶۰/۹٪ از این زنان خانه‌دار بودند.

نتیجه‌گیری: تعیین ژنوتیپ*HPV* و عوامل خطر مرتبط با عفونت*HPV* در هر منطقهٔ جغرافیایی می‌تواند منجر به تولید واکسن‌های موثر بر ویروس*HPV* شود. همچنین می‌تواند برای مدیریت بیماری و تشخیص حساسیت بالای نئوپلازی داخل اپیتلیال سرویکس مفید باشد.

کلمات کلیدی: اپیدمیولوژی، ژنوتیپ، پاپیلوما ویریده، سرطان دهانهٔ رحم

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

Fabrication - Retracted

مقدمه

سرطان دهانهٔ رحم شیوع جهانی دارد و شایع‌ترین نوع سرطان در کشورهای در حال توسعه به‌شمار می‌رود. از نظر فراوانی دومین سرطان شایع بین زنان است و سالانه بیش از ۴۰۰ هزار مورد از این بدخیمی در جهان گزارش می‌شود که ۱۲٪ سرطان‌های شایع بین زنان است. تاکنون عوامل متعددی به‌منظور تعیین میزان تاثیر یا دخالت آنها در پیدایش سرطان دهانهٔ رحم بررسی شده‌اند که مواردی مثل استعمال دخانیات، مصرف داروهای ضدبارداری، حاملگی، نوع تغذیه، بی بندوباری جنسی و بیماری‌های منتقل‌شده از طریق تماس جنسی به‌عنوان عوامل افزایش‌دهنده یا مستعدکنندهٔ خطرِ بروز سرطان دهانهٔ رحم معرفی شده‌اند. عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی (*HPV*) با ریسک بالا مهم‌ترین فاکتور ایجادکنندهٔ سرطان سرویکس است (۱). این امر در کشورهای در حال توسعه با منابع مالی کم، چالش توجه برانگیزی است (۲).*HPV* یکی از اعضای خانوادهٔ پاپیلوما ویریده است که به گروه‌های*HPV* خطرناک، احتمالاً خطرناک و کم‌خطر تقسیم می‌شود. تاکنون، توالی ۱۵۰ نوع *HPV* مشخص شده است. با توجه به مطالعات انجام شده، عفونت‌های مداوم*HPV* می‌تواند به سرطان دهانهٔ رحم منجر شود. مشخص شده است که برخی از

انواع پرخطر *HPV* مثل HPV ۱۶ ، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶، ۶۸ و ۷۰ نقش موثری در بروز سرطان دهانهٔ رحم می‌توانند داشته باشند (۳). در کشورهای مختلف مطالعات به‌نسبت زیادی از لحاظ فراوانی و ژنوتیپ‌های ویروس پاپیلومای انسانی انجام شده است که این مطالعات نشان می‌دهند شیوع ژنوتیپ‌ها در کشورهای مختلف، اکثراً متفاوت است. در متاآنالیزی که Bruni و همکاران انجام دادند، شیوع جهانی *HPV* ۱۱/۷٪ بود. براساس این مطالعه شیوع *HPV* در جنوب صحرای آفریقا ۲۴ درصد، اروپای شرقی ۲۱/۴٪ و آمریکای لاتین ۱۶/۱ ٪ بود (۴). براساس تحقیقات انجام شده در سال ۲۰۱۲ در ایران؛ شیوع عفونت *HPV* در زنان ۷٪ بود (۵). در میان انواع مختلف *HPV* که در ایران دیده می‌شود، شیوع *HPV*-۱۶ و *HPV* -۱۸ به ترتیب ۷/۳٪ و ۲/۸٪ است (۶). وضعیت اجتماعی ـ اقتصادی، سطح تحصیلات، زندگی در مناطق محروم و آداب و رسوم منطقه ای تاثیر بسیاری بر میزان آلودگی به *HPV* دارند (۷). سیگار کشیدن، مصرف الکل و سابقهٔ جنسی زنان، بعضی از عوامل خطر مهم برای کسب عفونت *HPV* هستند. تشخیص *HPV* و برنامهٔ غربالگری سازمان می‌تواند استراتژی ضروری برای درمان سرطان دهانه رحم باشد. بنابراین ارائهٔ روش های دقیق و سریع برای تشخیص و شناسایی *HPV* بسیار مفید و کمک‌کننده خواهد بود.

با شناسایی عوامل خطر درگیر در عفونت *HPV* و با توجه به آداب و رسوم و عادت‌های هر منطقهٔ خاص، روش‌های پیشگیری موثر و تشخیص سریع عفونت *HPV* می‌تواند به‌دست آید. این می تواند به ما کمک کند تا از میزان شیوع *HPV* در جامعه بکاهیم. بیشتر مطالعات انجام شده در زمینهٔ شیوع *HPV* در ایران فقط بر تعیین انواع *HPV* متمرکز شده‌اند. با این وجود، در این مطالعه، اطلاعاتی راجع به مشخصات اجتماعی و اقتصادی جمعیتی علاوه بر فراوانی نسبی *HPV* بررسی شد. هدف اصلی این مقاله، شناسایی فراوانی ژنوتیپ های *HPV* و بررسی عوامل خطر مرتبط با عفونت *HPV* در شهر تبریز است.

مواد و روش‌ها

جامعهٔ آماریِ مطالعه

مطالعهٔ حاضر مطالعه‌ای مقطعی بود که برای شناسایی فراوانی ژنوتیپ‌های *HPV* و بررسی عوامل خطر مرتبط با عفونت *HPV* در زنان مراجعه‌کننده به مرکز آموزشی و درمانی الزهرای تبریز انجام شد. جامعهٔ هدف، زنان مراجعه‌کننده به مرکز آموزشی و درمانی الزهرای تبریز بودند که از شهریور ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۵ برای مراقبت‌های بهداشتی و درمانی به این مرکز مراجعه کرده بودند. زنانی که در دورهٔ قاعدگی یا بارداری بودند یا سابقهٔ واکسیناسیون*HPV* داشتند، از مطالعه حذف شدند.

با تمام شرکت‌کنندگان از لحاظ سطح تحصیلات، ویژگی‌های جامعه‌شناختی، سن، ازدواج یا یائسگی، روش‌های پیشگیری از بارداری، بیماری‌های زمینه‌ای، سابقهٔ بیماری‌های منتقل‌شده از راه جنسی، سابقهٔ سیگارکشیدن و سابقهٔ جنسی یا تولید مثلی خود مصاحبه شد سپس روی آنها معاینات ژنیکولوژیک و آزمون پاپ اسمیر انجام شد.

ابتدا نمونه‌ها برای آنالیزهای مولکولی به منظور استخراج DNA، با استفاده از تیغ‌های یک بار مصرف از هر بلوک پارافینی به صورت برش‌های نازک بافت از افراد منتخب تهیه و در لوله‌های اپندورف ۲ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد. برای پیشگیری از هر گونه آلودگی برای هر نمونه از وسایل یک بار مصرف استفاده شد. این فرآیند زیر هود بیولوژیک Biosafety classII انجام شد. برای حذف پارافین، نمونه‌ها در مجاورت xylene به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس یک بار دیگر نیز xylene تازه به آنها اضافه شد تا در نمونه ها اثری از پارافین باقی نماند و طی سه مرحله شست‌وشو با اتانول مطلق ۹۰ ٪ و ۷۰٪ xylene از نمونه‌ها حذف شد.

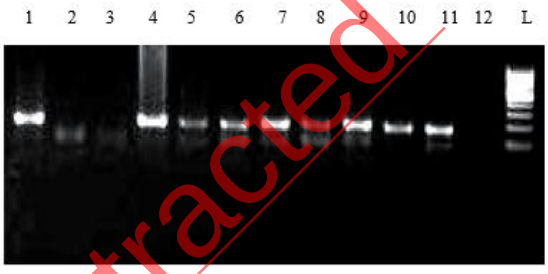
نمونه‌ها به مدت چند ساعت در گرم‌خانهٔ ۳۷ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند. سپس عمل هضم بافت با استفاده از بافر هضم [50 mM Tris (pH 8.5), 1mM EDTA, 0.5% Tween 20] دارای آنزیم proteinase K با غلظت 200 µg/ml و بعد از آن با استفاده از روش استخراج فنل ـ کلروفرم جداسازی DNA انجام شد. برای رسوب DNA از اتانول مطلق سرد استفاده و DNA استخراج شده تا انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای کنترل کیفی استخراج DNA و بررسی کیفیت قطعات DNA جدا شده از بافت‌هایِ آزمایش از روش PCR، با استفاده از جفت پرایمرهای (PCO3: 5′-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3′) و PCO4:(5′-CAACTTCATCCACGTTCACC-3′) بهره گرفته شد که قطعه‌ای به طول bp110 را از ژن β-globin انسانی تکثیر می‌کنند. نمونه‌هایی که از نظر وجود ژن β -globin مثبت بودند، برای انجام HPV-PCR انتخاب شدند. برای انجام PCR برای تشخیص HPV-DNA از جفت پرایمرهای زیر:

GP5+ (5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3') و GP6+ (5' GAAAAATAAA CTGTAAATCATATT3′) استفاده شد که قطعه‌ای به طول bp ۱۵۰ را از ناحیهٔ L1-ORF

Fabrication - Retracted

ژنومHPV تکثیر می‌کنند. این ناحیه به‌صورت حفاظت شده در ژنوم ویروس‌هایHPV است و می‌تواند برای جداسازی اکثر تیپ های این ویروس به روش PCR به‌خوبی استفاده شود.

برای تعیین ژنوتیپ پاپیلوما ویروس، ابتدا محصول PCR نمونه‌های HPV مثبت با استفاده از کیت‌های PCR product purification (QIAgene Germany) تخلیص شدند. سپس در آزمایشگاهViral-STD از مجموعه آزمایشگاه‌های ملی میکروبیولوژی کانادا با روش Automated Sequencing Microcapillary توالی ژنتیکی آنها مشخص شد.



تصویر۱. الکتروفورز محصولات HPV-PCR (ستون‌های ۱، ۱۰- ۴ = نمونه‌های مثبت، ستون‌های ۳-۲ = نمونه‌های منفی، ستون ۱۱= کنترل مثبت ، ستون ۱۲= کنترل منفی) L = (DNA ladder) DNA molecular wait marker پایین‌ترین باند ۱۰۰bp و بالاتر از آن ۲۰۰bp است.

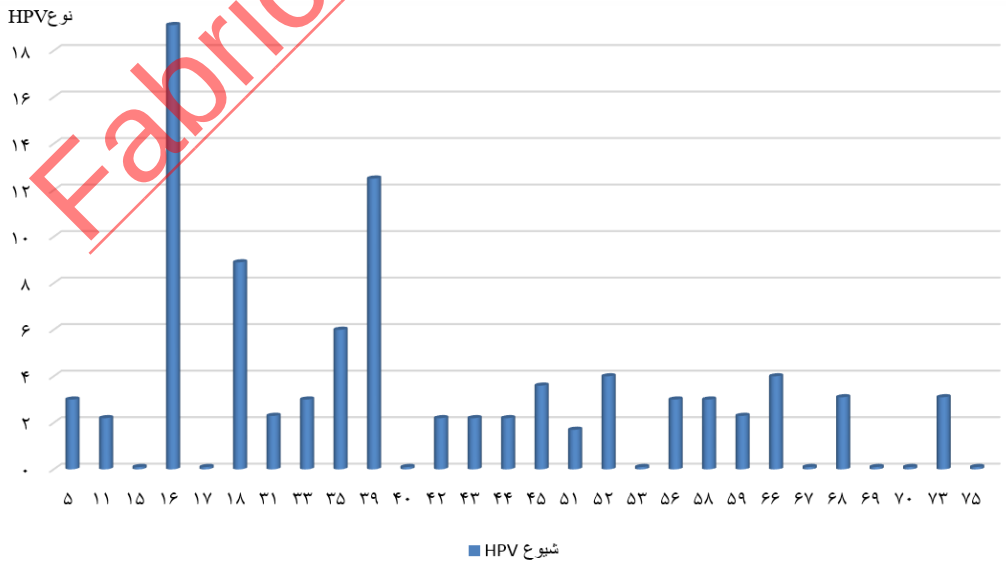
Statistical analysis

داده‌های حاصل از آزمون PCR و پرسش‌نامه‌ها به یک صفحهٔ گستردهٔ اکسل وارد شد. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخهٔ ۱۸) انجام شد. تمام متغیرهای کمی با میانگین ± SEM بررسی شدند و شیوع ویروس نوعHPV با استفاده از توزیع فراوانی خلاصه شد.

یافته‌ها

اجرای فرآیند PCR دربارهٔ ژن β-globin نشان داد که تمامی نمونه‌ها از نظر کیفیت DNA جدا شده در وضعیت مطلوب بوده و برای اجرای *HPV* PCR مناسب هستند. از ۴۰۰ نمونه بافت سرطانی جدا شده از بیماران، ۱۵۵ نمونه (۳۸/۷۵٪ مثبت بودند و ۲۴۵ مورد (۶۱/۲۵٪) از نمونه‌ها در آزمایش *HPV* PCR نتیجهٔ منفی نشان دادند.

میانگین سنی بیماران ۴۰/۴۷ سال و همگی در محدودهٔ سنی ۲۰ تا ۸۰ سال قرار داشتند. همچنین میانگین سن منارک و ازدواج در زنان مبتلا به *HPV* به ترتیب ۱/۵۷ ± ۱۳/۲۸ و ۴/۹۶ ± ۱۹/۳۸ سال بود و ۷۰/۴٪ از آنها، تا زمانی که این مطالعه در حال انجام بود، یائسگی را تجربه نکرده بودند. میانگین سن یائسگی در زنان *HPV* مثبت، ۶/۹۳ ± ۴۷/۲۹ سال بود. بیست و هشت نوع مختلف *HPV* تشخیص داده شد. یافته‌ها حاکی از حضور ژنوتیپ‌های ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۵۳،۴۰،۳۹ ، ۶۷، ۶۹، ۷۰ در نمونه‌هایِ بررسی بود که همگی متعلق به پاپیلوما ویروس بوده و معمولاً با سرطان‌های ناحیهٔ تناسلی در ارتباط هستند. تیپ ۱۶ با فراوانی ۱۹/۱٪ شایع‌ترین ژنوتیپ جداسازی شده تشخیص داده شد و به دنبال آن تیپ‌های۳۹ با فراوانی ۱۲/۵٪ و تیپ ۱۸ با فراوانی ۸/۹٪ قرار داشتند و تیپ‌های ۷۰، ۶۹، ۶۷ ، ۵۳ ، ۴۰، ۱۷، ۱۵ و ۷۵ کمترین شیوع را داشتند (نمودار ۱).



نمودار ۱. شیوع ژنوتیپی ویروس HPV بین نمونه‌های HPV مثبت

Fabrication - Retracted

۲۲/۴٪ زنان *HPV* مثبت هرگز از روش پیشگیری از بارداری استفاده نکردند (جدول ۱). ۸۷/۲٪ از آنها سابقهٔ ابتلا به بیماری های منتقل شده از راه جنسی (STDs) نداشتند، ۹۳/۶ سال هیچ سابقه بدخیمی نداشتند و فقط ۳۱/۴٪ از آنها بیماری زمینه‌ای داشتند. بررسی پرسش‌نامه‌ها نشان داد که ۰/۶٪ از زنان مطالعه شده ازدواج نکرده و باکره نیستند، ۸۷/۲٪ ازدواج کرده‌اند، ۷/۱٪ ازدواج دوم داشته‌اند و ۵/۸٪ به این سوال پاسخ نداده‌اند. در میان آنها ۸۰/۸٪ مادر بودند و میانگین سن اولین بارداری‌شان ۴/۸۰۱ ± ۲۰/۹۴ بود.

جدول ۱. فراوانی روش‌های استفاده شده برای پیشگیری از بارداری در زنان مبتلا به HPV

روش‌های پیشگیری از بارداری	فراوانی n(٪)
Oral contraceptive	۱۰ (۶/۴۱)
Tubal ligation	۱۵ (۹/۶)
Vasectomy	۶ (۳/۸)
Condoms	۲۶(۱۶/۶۶)
Oral contraceptives and natural family planning	۱(۰/۶)
Oral contraceptives and vasectomy	۱(۰/۶)
Condom and natural family planning	۳(۱/۹)
No method	۳۵(۲۲/۴۳)
withdrawal method during intercourse	۵۹(۳۷/۸۲)
Total	۱۵۶(۱۰۰)

سطح اجتماعی و اقتصادی زنان مبتلا به *HPV* بررسی و ارزیابی شد. اکثر زنان مبتلا به *HPV* مدرک تحصیلی دیپلم (۳۴/۶٪) داشتند. وضعیت اقتصادی‌شان متوسط (۶۹/۹٪) و ۶۰/۹٪ خانه‌دار بودند. مطالعه نشان داد که ۹۶/۸٪ از زنان *HPV* مثبت، سیگاری نبودند (جدول ۲).

جدول ۲. فراوانی HPVدر زنان مثبت Hookah smoke و Smoking

	فراوانی(٪)
Smoking	۳/۲
Hookah smoker	۶/۴

بحث

بروز موارد سالیانهٔ سرطان دهانهٔ رحم در سراسر دنیا بیش از ۴۵۰ هزار مورد است. اگرچه میزان مرگ و میر طی ۳۰ سال گذشته رو به کاهش بوده است ولی تقریباً ۲۰۰ هزار مرگ ناشی از سرطان دهانهٔ رحم در هر سال اتفاق می‌افتد. سالانه در آمریکا بیش از ۱۲ هزار مورد جدید سرطان دهانهٔ رحم تشخیص داده می‌شود و ۴۰۰۰ مرگ ناشی از این بیماری است. پاپیلوما ویروس انسانی قطعاً به‌عنوان عامل اصلی ایجادکنندهٔ بدخیمی‌های رحم و سرطان پیش‌روندهٔ رحم تلقی می‌شود (۱). عفونت ویروس‌های پاپیلومای انسانی، یکی از رایج‌ترین عفونت‌های منتقل‌شده از طریق تماس جنسی در جهان محسوب می‌شود. بالغ بر ۱۰۰ ژنوتایپ از این ویروس‌ها شناخته شده است که دستِ کم ۱۳ژنوتایپ آن به عنوان تایپ‌های انکوژنیک یا پرخطر طبقه‌بندی شده‌اند. در این میان، ۱۶- *HPV* در ایجاد سرطان دهانهٔ رحم در جایگاه اول قرار دارد. همچنین اهمیت ۱۶- *HPV* در سرطان‌های دیگر مثل سینه، ریه و پروستات بررسی شده است.

در مطالعهٔ Sigaroodi و همکاران که به منظور بررسی ارتباط احتمالی بین عفونت ویروس پاپیلومای انسانی و خطر سرطان سینه در زنان شمال ایران روی ۷۹ نمونهٔ بیمار و ۵۱ نمونهٔ شاهد انجام شد، ۱۵ نمونه (۲۵/۹٪) از گروه بیماران و ۱ نمونه (۲/۴٪) از گروه شاهد از نظر ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی، مثبت بودند. ژنوتیپ‌های پرخطر ۱۶،۱۸ *HPV* به عنوان ژنوتیپ های غالب معرفی شدند(۱۶- *HPV* با ۴ مورد (۲۵٪) و ۱۸- *HPV*با ۴ مورد(۲۵٪)). در این مطالعه عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی به‌عنوان یک عامل خطر برای ابتلا به سرطان سینه ذکر شد (۱۰).

در مطالعهٔ Nadji و همکاران که روی ۱۴۱ بیمار دارای سرطان ریه و ۹۲ بیمارِ شاهد (فاقد سرطان ریه) در مازندران انجام

Fabrication - Retracted

شد، ۳۳ نمونه (۲۵/۶٪) از بین ۱۴۱ نمونهٔ بیماران و ۸ نمونه (۹٪) از بین گروه شاهد از نظر ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی، مثبت اعلام شدند و آلودگی با ژنوتیپ‌های پرخطر ۱۶و ۱۸ به میزان چشمگیری مشاهده شد (۷۲/۷٪). در این مطالعه با مقایسهٔ دو گروه بیمار و شاهد، بین عفونت پاپیلومای ویروس های انسانی و ایجاد سرطان ریه ارتباط وجود داشت (۱۱).

در مطالعهٔ Aghakhani و همکاران که به منظور بررسی ارتباط آلودگی با ویروس پاپیلومای انسانی و سرطان پروستات روی ۱۰۴ نمونه بیمار با سرطان پروستات و ۱۰۴ نمونهٔ شاهد (با هایپرپلازی خوش‌خیم) انجام شد، ۱۳ نمونه از ۱۰۴ نمونهٔ بیماران(۱۲/۵٪) و ۸ نمونه (۷/۷٪) از ۱۰۴ نمونه گروه شاهد از نظر ویروس پاپیلومای انسانی، مثبت بودند. آلودگی با انواع پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی (ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۸) در ۷۶/۹٪ از بیماران و ۶۲/۵٪ از گروه شاهد مشاهده شد. در این مطالعه اگرچه ارتباطی بین عفونت با ویروس‌های پاپیلومای انسانی و سرطان پروستات مشاهده نشد اما شیوع بالای ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۸ در نمونه‌های مثبت از لحاظ ویروس پاپیلومای انسانی، مشاهده شد (۱۲).

در مطالعهٔ Hosseini و همکاران در سال ۲۰۱۰، شیوع عفونت ویروس پاپیلومای انسانی در ۸۲۵ نمونهٔ دهانهٔ رحم حاصل شده از زنان مراجعه کننده به درمانگاه سلامت دانشگاه شهید بهشتی تهران، ۷/۸٪ گزارش شد که ۵/۱٪ از این مقدار را ژنوتیپ های پرخطر به خود اختصاص داده بود. در این مطالعه، ۱۶-*HPV*به عنوان رایج‌ترین ژنوتیپ بین نمونه‌های با سلول‌شناسی طبیعی (۱/۸٪) و غیرطبیعی(۸/۸٪) گزارش شد.

در مطالعهٔ حاضر، ($\frac{155}{400}$)۳۸/۷۵٪ از زنان مطالعه، *HPV* مثبت بوده و با یک یا چند نوع *HPV* آلوده شده بودند. ۲۲ نوع *HPV* از جمله *HPV* ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۰، ۴۵ ، ۵۱، ۵۲ ، ۵۳ ، ۵۶ ، ۵۸ ، ۵۹، ۶۶، ۶۷، ۶۸، ۷۰، ۷۳ و ۷۵ مشاهده شد. شیوع انواع *HPV* در مناطق مختلف جغرافیایی متغیر است. براساس مطالعات انجام شده در ایران، شیوع ۱۶- *HPV* بیشتر از سایر انواعِ آن است. در مطالعه‌ای که در ایران انجام شد، شیوع توتال *HPV* در ایران از بین ۷۶۵۵ زن ۹/۴٪ و شیوع *HPV* ۱۶ و ۱۸ به ترتیب۲/۰۳٪ و ۱/۷٪ بود. شیوع ۱۶- *HPV* در ۲ بیمارستان در تهران ۷۶ ٪، در بیمارستان دیگری در تهران ۷/۳٪ و در اصفهان ۱۵/۲۱٪ بود (۱۳). در مطالعهٔ Clifford و همکارانش *HPV* ۱۸، ۴۵، ۳۱ و ۳۳ به‌ترتیب شایع‌ترین انواع *HPV* بعد از ۱۶- *HPV* بودند (۱۴). در آسیا، ۵۲- *HPV* و ۵۸ - *HPV* به ترتیب بعد از ۱۶- *HPV* و ۱۸ شایع‌ترین انواع بودند (۱۵). بررسی ما نشان داد که پس از ۱۶- *HPV* ، ۳۹- *HPV* (۱۶/۲٪) و ۱۸- *HPV* (۱۲/۶٪) به ترتیب شایع‌ترین انواع *HPV* هستند. با این حال Salehi-Vaziri و همکارانش گزارش کردند که در ایران ۳۹- *HPV* (۹/۱٪) شایع‌ترین نوع *HPV* بعد از ۱۶- *HPV* (۳۲/۸٪) است (۱۶). همان طور که قبلاً ذکر شد تفاوت در انواع *HPV* می‌تواند به علت توزیع جغرافیایی مختلف این ویروس باشد.

در مطالعهٔ ما بیشترین میزان شیوع *HPV* در سن ۳۶ سالگی (۷/۷٪) و در سن ۴۶ سالگی (۵/۸٪) مشاهده شد. در مطالعهٔ Dunne و همکاران، شیوع عفونت *HPV* در سنین ۱۴ تا ۲۴ سالگی افزایش یافته و در سنین بالاتر، میزان عفونت *HPV* به تدریج کاهش یافت. بیشترین میزان شیوع عفونت *HPV* در سنین زیر ۲۰ سال مشاهده شد. شیوع *HPV* در خانم‌های ۵۰ ساله۱۹/۶٪، شصت ساله ۲۵/۲٪ و در سنین ۳۰ سالگی ۲۷/۵٪ بود. این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در تعداد و نوع جمعیت مطالعه شده باشد. مطالعات در کشورهای مختلف نشان داده است که میزان عفونت *HPV* در زنان جوان بالا است که ممکن است به دلیل فعالیت جنسی بالای آنها در طول این دورهٔ زندگی باشد اما میزان عفونت *HPV* در دهه‌های چهارم و پنجم زندگی، به‌تدریج کاهش می‌یابد (۱۸، ۱۷،۳). با این حال، خطر ابتلا به عفونت *HPV* در زنان فعال شده از نظر جنسی در تمام سنین وجود دارد (۱۹). Rossi و همکاران گزارش کرده‌اند که سن، یکی از عوامل خطر مهم برای ابتلا به عفونت *HPV* با خطر بالا است و عفونت *HPV* با افزایش سن زنان کاهش می‌یابد (۲۰). نتایج این تحقیق نشان داد که در همهٔ رده‌های سنی، بیشترین نوع ابتلا به ویروس، ۱۶-*HPV* (۱۹/۱٪) است و بیشترین میزان عفونت در ۳۸ سالگی مشاهده شد. در کل، در ایران متوسط سن منارک ۱۲/۸۱ سال گزارش شده است (۲۱). در تحقیق ما، سن منارک بیشتر زنان مبتلا به *HPV* ۱۳ سال و شایع‌ترین نوع آن ۱۶-*HPV* بود. بالاترین فراوانی سن در زنان یائسه و در۵۰ سالگی مشاهده شد که اکثر آنها مبتلا به ۱۶-*HPV* بودند. یافته‌های این مطالعه با مطالعهٔ Smith و همکاران مطابقت داشت که ۱۶ -*HPV* شایع‌ترین نوع در میان زنان یائسه بود (۲۲). در مطالعهٔ حاضر، ۱۶ -*HPV* شایع‌ترین نوع در زنانی بود که در طول مقاربت، استفاده از IUD و روش ترک طبیعی را انجام داده‌اند. در زنانی که سابقهٔ بیماری انتقال

Fabrication - Retracted

جنسی و سابقهٔ بدخیمی داشتند، *HPV-۱۶* شایع‌ترین نوع بود. *HPV-۳۵* و *HPV-۳۸* به عنوان انواع غالب در زنان مبتلا به بیماری زمینه‌ای شناسایی شده‌اند اما *HPV-۱۶* بیشتر در کسانی مشاهده شد که بیماری زمینه‌ای نداشتند.

در ایران، میزان زنان سیگاری از ۱۰/۵ تا ۰/۰۴ درصد متغیر است و در مقایسه با میزان‌های گزارش شدهٔ سازمان جهانی بهداشت، کمترین میزان است (۲۳). نتایج این مطالعه نشان داد که در میان زنانی که مصرف سیگار و قلیان داشتند، ۱۶ -*HPV* ژنوتیپ غالب *HPV* است. مشابه با این نتیجه، براساس مطالعه انجام شده در منطقه شمال شرقی هند، ۱۶ -*HPV* شایع‌ترین نوع در میان بیماران سرطان سر و گردن بود که عادت مصرف دخانیات داشتند (۲۴). مطالعات نشان داده‌اند که عفونت ۱۶ -*HPV* و استفاده از سیگار دو عامل مهمی هستند که می‌توانند به گسترش سرطان دهانهٔ رحم کمک کنند (۲۵). لازم به ذکر است که در ایران سیگار کشیدن میان زنان رایج نیست. با توجه به یافته‌های Giorgi Rossi و همکارانش، زنان کم درآمد اجتماعی اطلاعات کمی دربارهٔ عفونت *HPV* و سرطان دهانهٔ رحم داشتند (۳۵). در مطالعه دیگری هم اشاره شده است که سطوح پایین‌تر تحصیلات و وضعیت اقتصادی به طور معکوس با بروز سرطان‌های ناشی از عفونت *HPV* همراه است (۲۶). در مطالعهٔ حاضر زنان با وضعیت متوسط اجتماعی و اقتصادی بیشترین میزان ابتلا به *HPV* را داشتند و در این گروه بیشتر، ۱۶ -*HPV* مشاهده شد. بر اساس این شواهد همچنین با سطح سواد پایین‌تر از زنان، *HPV* مثبت دیده شود. تحقیقاتِ Catarino و همکارانش نشان داد که یک زن خانه‌دار می‌تواند عامل خطری برای ابتلا به عفونت *HPV* باشد (۲۷). همچنین، دریافتیم که ۶۰/۹٪ زنان مبتلا به *HPV*، خانم‌های خانه‌دار با شیوع زیاد ۱۶ -*HPV* هستند. پس از آن، ۳۹-*HPV* و ۱۸ -*HPV* بالاترین شیوع عفونت *HPV* را در میان دیگر انواع HPV نشان دادند.

لازم به توضیح است روش‌های سرولوژیک و کشت روش‌های حساس و اعتماد برانگیزی برای تشخیص *HPV* نیستند، از این رو از تست‌های دقیق و سریع برای تشخیص استفاده می‌شود (۸، ۹).

آزمایش Pap smear به‌دلیل سهولت و ارزانی نسبی به‌عنوان تست رایجی برای غربالگری بیماران در سراسر جهان استفاده می شود ولی متاسفانه در این تست، موارد منفی کاذب بسیار زیاد است (۲۸). عفونت‌های *HPV* معمولاً بدون علامت هستند، لذا برای تشخیص آنها به روش‌هایی برای بهبود روند غربالگری نیاز است (۲۹). مطالعات اپیدمیولوژیک و کوشش‌هایی که برای تولید واکسن صورت می‌گیرد نیاز به روش‌های اعتمادبرانگیزی برای تشخیص عفونت‌های تناسلی *HPV* و تعیین ژنوتیپ‌های رایج در عفونت دارد. روش‌هایی همچون PCR که DNA ویروس را ردیابی می‌کند، در واقع عامل عفونت را شناسایی می‌کند در حالی که تست‌های سیتولوژی همچون Pap smear ضایعات و عوارض حاصل از عفونت را مشخص می‌کنند (۲۸). تکنیک PCR به دلیل توانایی در تکثیر DNA ویروس، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به عنوان یکی از حساس‌ترین روش‌ها برای شناسایی HPV در بافت های تناسلی محسوب می‌شود و توام شدن آن با روش sequencing به عنوان تستی تاییدی دقت آن را تا ۱۰۰٪ هم افزایش می‌دهد. لذا به‌کارگیری آن در کنار روش‌های سیتولوژیک می‌تواند در افزایش قدرت تفکیک و دقت بررسی‌های کلینیکی بیماران به‌نحو چشمگیری موثر باشد. همچنین تعیین ژنوتیپ‌های شایع در یک منطقهٔ جغرافیایی می‌تواند در بررسی‌های اپیدمیولوژیک و برنامه‌های توسعهٔ واکسیناسیون برعلیه *HPV* بسیار حائز اهمیت باشد (۳۰).

در این بررسی ۲۴۵ نفر از ۴۰۰ زن مطالعه شده که از نظر پاتولوژی بیمار تشخیص داده شده بودند، در آزمایش PCR *HPV* نتایج منفی نشان دادند. چند احتمال دربارهٔ توجیه این مطلب وجود دارد: یکی اینکه تشخیص ضایعات بدخیم و سرطانی در این افراد به‌واسطهٔ عامل سرطان‌زای دیگری غیر از ویروس *HPV* بوده است. دلیل دیگر اینکه براساس مجموعه‌ای از مطالعات، علت وقوع نتایج منفی کاذب در آزمایش‌های PCR به‌ویژه در مواردی که تست‌های پاتولوژیک حکایت از وجود سرطان‌های بدخیم و مهاجم دارند، می‌تواند به نحوهٔ جایگزین‌شدنِ ژنوم ویروس در کروموزوم سلول میزبان مربوط باشد. بر طبق یکی از فرضیات ژنوم حلقوی ویروس به گونه‌ای در کروموزوم سلول میزبان جایگزین می‌شود که ناحیهٔ ژنی را که هدف فرآیند PCR بوده است دستخوش دگرگونی کرده و موجب تغییر در نتایج PCR شود. اگرچه معمولاً ناحیهٔ ژن E2 از ژنوم ویروس طی روند جایگزینی تخریب می‌شود اما در بعضی موارد ممکن است توالی‌های اتصال پرایمر PCR در ناحیهٔ ژنی L1 با نواحی تخریب شدهٔ ژنوم ویروس مقارن بوده، در نتیجه در ردیابی DNA *HPV* با روش PCR خللی ایجاد شود (۳۱-۳۳). عامل دیگری که می‌تواند در منفی کاذب شدن نتایج PCR موثر باشد. اشکالاتی است که در فرآیند آماده‌سازی و استخراج DNA از نمونه‌های تثبیت شده با فرمالین و پارافینه شده به وجود می‌آید.

Fabrication - Retracted

بنابراین به منظور جبران ناکارآمدی روش پاپ اسمیر در پیشگویی بدخیمی، روش‌های مولکولی را می‌توان جایگزینی قوی در نظر گرفت. به گونه‌ای که حتی قادر به شناسایی تیپ ویروس نیز هستند. با توجه به این واقعیت که تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ این ویروس عامل ۷۰٪ از بدخیمی‌ها و تهاجمی‌تر از بقیهٔ تیپ‌های ویروسی هستند، روش مولکولی می‌تواند پیشگویی دقیق‌تر، حساس‌تر و سریع‌تری داشته باشد. حتی می‌تواند در تصمیم‌گیری روش درمان با توجه به تیپ گزارش شده نیز مداخله کند. یکی از محدودیت‌های مطالعهٔ حاضر، تعداد کمِ افراد شرکت‌کننده بود که لازم است مطالعات دیگری با تعداد افراد بیشتری انجام شود. از دیگر محدودیت‌های این مطالعه، دسترسی نداشتن به پروندهٔ بهداشتی افراد و اعتماد به گفته‌های آنها دربارهٔ داشتن شریک جنسی غیر از همسر خود یا زن دوم داشتن همسرشان بود.

در پایان باید عنوان کرد شناسایی ژنوتیپ *HPV* و عوامل خطر مرتبط با ابتلا به *HPV* در هر منطقه می‌تواند منجر به ایجاد یک برنامهٔ غربالگری موثر و افزایش سطح آگاهی اعضای جامعه شود. همچنین می‌تواند برای مدیریت بیماری و تشخیص حساسیت بالای نئوپلازی داخل اپیتلیال سرویکس مفید باشد. باید تحقیقات بیشتری برای بررسی ژنوتیپ *HPV* در منطقهٔ دیگری از ایران یا بخش دیگری از جهان انجام شود.

سپاسگزاری

نویسندگان، مراتب سپاس خود را از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز ابراز می‌دارند که پشتیبانی مالی این پروژه را بر عهده داشتند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

Fabrication - Retracted

References

1. Jamali S , Jamali B. Investigation of the genetic diversity of HPV in cervical cancer. 7th Iranian congress of virology. (10-11may 2017).
2. Parkin DM, Bray F. The burden of HPV-related cancers. Vaccine. 2006;24:S11-S25. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.111 PMid:16949997
3. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003;16(1):1-17. https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003 PMid:12525422 PMCid:PMC145302
4. Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. J Infect Dis. 2010;202(12):1789-99. https://doi.org/10.1086/657321 PMid:21067372
5. Khorasanizadeh F, Hassanloo J, Khaksar N, Taheri SM, Marzaban M, Rashidi BH, et al. Epidemiology of cervical cancer and human papilloma virus infection among Iranian women—Analyses of national data and systematic review of the literature. Gynecol Oncol. 2013;128(2):277-81. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.11.032 PMid:23200918
6. Yousefzadeh A, Mostafavizadeh SM, Jarollahi A, Raeisi M, Garshasbi M, Siavashvahabi Z, et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among women attending regular gynecological visit in Tehran, Iran. Clin Lab. 2014;60(2):267-73. https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2013.130221
7. Giorgi Rossi P, Baldacchini F, Ronco G. The possible effects on socio-economic inequalities of introducing HPV testing as primary test in cervical cancer screening programs. Front Oncol. 2014;4:20. https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00020 PMid:24575388 PMCid:PMC3919018
8. Möbius G. Cytological early detection of cervical carcinoma: possibilities and limitations. Analysis of failures. J Cancer Res Clin Oncol. 1993;119(9):513-21. https://doi.org/10.1007/BF01686460 PMid:8325903
9. Bashizadeh-Fakhar H, Ghane M, Faraji R, Ashoorizadeh B. Identifying Human Papilloma Virus (HPV) in Women with Genital Warts by Multiplex– PCR Method. ZJRMS. 2013;15(10):45-8.
10. Sigaroodi A, Nadji SA, Naghshvar F, Nategh R, Emami H, Velayati AA. Human papillomavirus is associated with breast cancer in the north part of Iran. Sci World J. 2012;2012.
11. Mokhtari-Azad T, Mahmoodi M, Yahyapour Y, Naghshvar F, Torabizadeh J, et al. Relationship between lung cancer and human papillomavirus in north of Iran, Mazandaran province. Cancer lett. 2007;248(1):41-6. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.05.016 PMid:16814459
12. Aghakhani A, Hamkar R, Parvin M, Ghavami N, Nadri M, Pakfetrat A, et al. The role of human papillomavirus infection in prostate carcinoma. Scand J Infect Dis. 2010;43(1):64-9.

https://doi.org/10.3109/00365548.2010.502904
PMid:20662618

13. Allameh T, Moghim S, Farahbod F. Reviewing the Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Married Women Aged 18-60 Years with Normal Pap Smear Referring to Gynecology Clinics in Hospitals Affiliated to Isfahan University of Medical Sciences, Iran. J Isfahan Medl School. 2012;29(163).1-8.

14. Clifford G, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. Br J Cancer. 2003;88(1):63-73. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600688 PMid:12556961 PMCid:PMC2376782

15. Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. Gynecol Oncol 2006;103(1):12-7. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.07.031 PMid:16934860

16. Salehi-Vaziri M, Sadeghi F, Hashemi FS, Haeri H, Bokharaei-Salim F, Monavari SH, et al. Distribution of Human Papillomavirus genotypes in Iranian women according to the severity of the cervical lesion. Iran Red Crescent Med J. 2016;18(4):e24458. https://doi.org/10.5812/ircmj.24458 PMid:27257511 PMCid:PMC4888845

17. Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. Am J Manag Care. 2006;12(17 Suppl):S462-72. PMid:17203990

18. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. J Infect Dis. 2005;191(11):1808-16. https://doi.org/10.1086/428779 PMid:15871112

19. Castellsagué X, Schneider A, Kaufmann AM, Bosch FX. HPV vaccination against cervical cancer in women above 25 years of age: key considerations and current perspectives. Gynecol Oncol. 2009;(3 Suppl):S15-23. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.09.021 PMid:19819540

20. Rossi PG, Baldacchini F, Ronco G. The possible effects on socio-economic inequalities of introducing HPV testing as primary test in cervical cancer screening programs. Frontiers Oncol. 2014;4:20.

21. Benard VB, Johnson CJ, Thompson TD, Roland KB, Lai SM, Cokkinides V, et al. Examining the association between socioeconomic status and potential human papillomavirus- associated cancers. Cancer. 2008;113(10 Suppl):2910-8. https://doi.org/10.1002/cncr.23742 PMid:18980274

22. Smith E, Johnson S, Ritchie J, Feddersen D, Wang D, Turek L, et al. Persistent HPV infection in postmenopausal age women. Int J Gynecol Obstet. 2004;87(2):131-7. https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2004.07.013 PMid:15491557

23. Halimi L, Haghdoost AA, Alizadeh SM. Prevalence of cigarette smoking among Iranian women: a systematic review and meta-analysis. Med J Islam Repub Iran. 2013;27(3):132-40. PMid:24791123 PMCid:PMC3917490

24. Kumar R, Rai AK, Das D, Das R, Kumar RS, Sarma A, et al. Alcohol and tobacco increases risk of high risk HPV infection in head and neck cancer patients: Study from North-East Region of India. PloS One. 2015;10(10):e0140700. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140700 PMid:26473489 PMCid:PMC4608822

25. Dimitrov G, Džikova E, Dimitrov G, Babushku G, Antovska V. The influence of HPV16,smoking and coitarche in the development of cervical dysplasia in the stage where conization is the treatment of choice. Acta Facult Med Naissens. 2012;29(4):181-6.

26. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. Vaccine. 2012;30:F12-F23. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.055 PMid:23199955

27. Catarino R, Vassilakos P, Tebeu P-M, Schäfer S, Bongoe A, Petignat P. Risk factors associated with human papillomavirus prevalence and cervical neoplasia among Cameroonian women. Cancer Epidemiol. 2016;40:60-6. https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.11.008 PMid:26625088

28. Allan BR, Marais DJ, Denny L, Hoffman M, Shapiro S, Anna-Lise W. The agreement between cervical abnormalities identified by cytology and detection of high-risk types of human papillomavirus. S Afr Med J. 2006;96(11):1186-90. PMid:17167705

29. Kornegay JR, Roger M, Davies PO, Shepard AP, Guerrero NA, Lloveras B, et al. International proficiency study of a consensus L1 PCR assay for the detection and typing of human papillomavirus DNA: evaluation of accuracy and intralaboratory and interlaboratory agreement. J Clin Microbiol. 2003;41(3):1080-6. https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1080-1086.2003 PMid:12624033 PMCid:PMC150263

30. Soper D. Reducing the health burden of HPV infection through vaccination. Infect Dis Obstet

Fabrication - Retracted

Gynecol. 2006;2006: 83084. https://doi.org/10.1155/IDOG/2006/83084 PMid:16967913 PMCid:PMC1522061

31. Santos, S.R., L.Zeferino, L.Villa.2003.Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil.mem inst Oswaldo cruz,98:181-184 http://dx.doi.org/10.1155/2017/1645074

32. Gallo, G., m.Bibbo, L.Bagella.2003.Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL.j.clin.pathol, 56:532-536. http://dx.doi.org/10.1136/jcp.56.7.532

33. Carbone, M., G.Klein, J.Gruber.2004.Modern criteria to establish human cancer etiology. Cancer research journal, 64:5518-5524. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034674

Fabrication - Retracted