SJRM SAREM JOURNAL OF REPRODUCTIVE MEDICINE

Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2017;2(2):113-116

Human Papiloma Virus Detection in Various Cervical Lesions by Molecular Methods

ARTICLE INFO

Article Type
Original research

Authors
Hasani M.* *MSc*,
Salehian P.[1] *MD*,
Pourazar Sh.[2] *MSc*

How to cite this article
Hasani M, Salehian P, Pourazar Sh. Human Papiloma Virus Detection in Various Cervical Lesions by Molecular Methods. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2017;1(3):113-116.

ABSTRACT

Aims Human Papilloma Virus (HPV) is known as one of the causes of anogenital cancers, including cervix cancer. The inability of viral culture has made the initial detection of HPV difficult. Therefore, molecular methods are the best way to identify, and among these methods, Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification methods are very useful and accurate in diagnosis. The aim of this study was to investigate the presence of HPV in Iranian patients and the relationship between the type of virus (high risk and low risk) and cervical lesions by molecular methods based on PCR virus samples.

Materials & Methods The present study was conducted on 67 biopsy and Liquid base cytological samples including cervical Liquid cytology and cervical tissue biopsy. The cytological diagnostic test and pathological examination were performed and the DNA was extracted and then, DNA typing was conducted by PCR using primers MY09/MY11, specific for capsid gene.

Findings Out of 67 patients, 2 cases (3.0%) were not infected with HPV, while cervical cytology was symptomatic. Seven cases had no symptoms in the cervical epithelial cells, which were virtually positive for the virus, and the rest also had both viral and clinical symptoms. Most of the samples (52.2%) were infected with high-risk viruses and, most of them were HPV16.

Conclusion HPV can be the main responsible for the cervical cells changes, that has the ability to become cancerous. Also, in most cases, the main cause of the infection is high-risk type of the virus. The most prevalent type of HPV that infected cervical epithelial cells is HPV16.

Keywords Human Papilloma Virus; Uterine Cervical Erosion; Molecular Diagnostic Technique

*Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran
[1]Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran
[2]Masoud's Pathobiology Lab, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Sarem Women's Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran. Postal Code: 1396956111
Phone: +98 (21) 44670888
Fax: +98 (21) 44670432
mha1353@gmail.com

Article History
Received: March 15, 2016
Accepted: January 14, 2016
ePublished: August 15, 2017

CITATION LINKS

[1] Treatment of Condyloma acuminatum with krayotherapy [2] HPV DNA testing: Technical and programmatic issues for cervical cancer prevention in low-resource settings [3] Definitions & Characteristics of HPV: Merck Medicos Modules [4] Andrews' Diseases of the Skin [5] Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in the female genital tract [6] Study of human papilloma virus in anogenital condylomas by PCR method [7] Cervical intraepithelial neoplasia 3, coinfected with HPV-16 and -18 -case report [8] Methods for HPV detection: Polymerase chain reaction assays [9] Viral infections [10] Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: Baseline results from a randomized trial [11] Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens [12] Utilization of human papillomavirus testing for cervical cancer prevention in a university hospital

Copyright© 2017, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

بررسی حضور پاپیلوما ویروس انسانی در انواع ضایعات دهانه رحم با کمک روش‌های مولکولی

معصومه حسنی MSc
پژوهشکده سلولی- مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران
پیروز صالحیان* MD
پژوهشکده سلولی- مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران
شاهین پورآذر MSc
آزمایشگاه پاتوبیولوژی مسعود، تهران، ایران

چکیده
اهداف: ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) به‌عنوان یکی از علل سرطان‌های آنوژنیتال از جمله سرطان رحم شناخته می‌شود. عدم توانایی کشت ویروسی، موجب شده است تا شناسایی اولیه ویروس سخت باشد. بنابراین روش‌های مولکولی بهترین راه شناسایی است و در میان این روش‌ها، روش‌های بر پایه تکثیر با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در امر تشخیص بسیار مفید و دقیق هستند. هدف این پژوهش، بررسی وضعیت حضور HPV در نمونه بیماران ایرانی و رابطه نوع ویروس (نوع پرخطر و کم‌خطر) با ضایعات دهانه رحم با روش‌های مولکولی و بر پایه PCR نمونه ویروس بود.
مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر روی ۶۷ نمونه بیوپسی و سیتولوژی مایع شامل سیتولوژی مایع دهانه رحم و بیوپسی بافت سروکیس انجام شد. آزمون تشخیصی سیتولوژی و بررسی آسیب‌شناسی انجام و DNA استخراج شد و سپس به‌کمک پرایمرهای اختصاصی MY09/MY11 مخصوص ژن کپسیدی، تایپینگ به‌روش PCR انجام شد.
یافته‌ها: از ۶۷ نمونه بیمار، ۲ مورد (۳%) با وجود علایم در سیتولوژی دهانه رحم، به HPV آلوده نبودند. ۷ مورد فاقد علایم در سلول‌های اپی‌تلیال سروکیس بودند که البته از نظر ویروس، مثبت بودند و بقیه نیز هم واجد ویروس و هم علایم بالینی بودند. بیشتر نمونه‌ها (۵۲/۲%) به انواع پرخطر ویروس آلوده بودند، که اغلب آنها نوع ۱۶ ویروس بودند.
نتیجه‌گیری: HPV را می‌توان مسئول اصلی علایم تغییرات سلول‌های دهانه رحم دانست که قابلیت تبدیل‌شدن به سرطان را دارد. همچنین در اکثر موارد عامل اصلی آلودگی، تیپ‌های پرخطر ویروس هستند. شایع‌ترین تیپ ویروسی آلوده‌کننده اپی‌تلیال دهانه رحم HPV16 است.
کلیدواژه‌ها: ویروس پاپیلوهای انسانی، ضایعات دهانه رحم، آزمون تشخیص مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۵
*نویسنده مسئول: mha1353@gmail.com

مقدمه

با کمک روش‌های مولکولی، بیشتر از ۱۰۰ نوع متفاوت ویروس پاپیلومای انسانی شناخته شده است. حدوداً ۴۰-۳۰% تیپ‌های مختلف این ویروس موجب آلودگی‌های مخاطی، به‌ویژه در نواحی آنوژنیتال هستند. این ویروس‌ها از نظر پتانسیل توانایی در ایجاد سرطان به دو تیپ پرخطر و کم‌خطر تقسیم می‌شوند. البته در برخی منابع آنها را به سه تیپ کم‌خطر، متوسط و پرخطر طبقه‌بندی کرده‌اند. اکثر ویروس‌های پاپیلومای آلوده‌کننده دهانه رحم و نواحی آنوژنیتال از انواع پرخطر بوده و توانایی ایجاد سرطان دهانه رحم (کارسینومای رحم) را دارند. از نظر ویروس‌شناسی، پاپیلوماویروس به گروه ویروس‌های برهنه (فاقد پوشش) با کپسید ۲۰وجهی متعلق بوده و ۸ ژن اولیه و تنظیمی، ۲ ژن ساختمانی L1 و L2 و کپسید با بیان تاخیری دارند. ژن و پروتئین کپسیدی تقریباً در میان تمام تیپ‌های ویروس مشترک بوده و در اکثر روش‌های مولکولی به‌عنوان اساس جداسازی ویروس از نمونه بیمار قرار می‌گیرند. از بین ۸ ژن تنظیمی، ژن‌های e6 و e7 توانایی ویروس در تبدیل ضایعه به کارسینومای رحم را مشخص می‌کنند. بنابراین اولین قدم ضروری در تشخیص حضور ویروس در نمونه دهانه رحم و سایر نمونه‌های به‌دست‌آمده از بیمار، جداسازی DNA ویروس است. عفونت ویروسی عامل حدود یک‌پنجم سرطان‌های انسانی است و HPV (ویروس پاپیلومای انسانی) از مهم‌ترین انکوویروس‌ها به‌شمار می‌رود که نه‌تنها در نواحی آنوژنیتال بلکه در مجاری تنفسی و ریه، مخاط و پوست سر و گردن و غیره نیز ضایعه ایجاد می‌کند و تیپ ۱۶ و ۱۸ آن موجب سرطان می‌شوند. عفونت‌های آنوژنیتال به‌فرم زگیل، کندیلوما آکومیناتا، ضایعات مخاط دهانه رحم (CIN) ظاهر می‌شود[1]. ضایعات رحم به‌فرم خفیف زخم دهانه رحم، ضایعات اپی‌تلیالی به‌صورت خفیف LSIL، شدید HSIL و کارسینومای رحم ناشی از عفونت با HPV می‌توانند وجود داشته باشند[2, 3]. این ضایعات بر مبنای طبقه‌بندی Bethseda به‌صورت CINII، CINI، CINIII یا CIS تقسیم می‌شوند.

معمول‌ترین تیپ‌های HPV انواع ۶ و ۱۱ هستند، اما عفونت با انواع ۱۶ و ۱۸ نیز معمول است[4, 5]. زگیل آنوژنیتال یک عفونت و بیماری منتقل‌شونده از راه تماس جنسی است که در هر دو جنس بروز می‌کند و مشکل کلینیکی جدی برای زنان محسوب می‌شود[6]. رابطه ویروس پاپیلوما با ضایعات بدخیم و پیش‌رونده و نیز سرطان رحم به‌خوبی شناسایی شده است. امروزه با روش‌های مختلف مانند تکثیر DNA هدف با PCR و روش Hybrid capture این ویروس به‌صورت دقیق شناسایی می‌شود[2, 5].

این پژوهش با هدف بررسی وضعیت حضور ویروس پاپیلومای انسانی در نمونه بیماران ایرانی و رابطه نوع ویروس (نوع پرخطر و کم‌خطر) با ضایعات دهانه رحم با روش‌های مولکولی و بر پایه PCR نمونه ویروس انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر روی ۶۷ نمونه دهانه رحم به‌فرم سیتولوژی مایع (LBC) و ارزیابی نمونه بافت دهانه رحم، با روش‌های مولکولی و بر پایه PCR در بیمارستان صارم صورت گرفت.

به‌وسیله کیت استخراج (QIAGEN)، DNA نمونه‌های واجد ضایعات دهانه رحم، کندیلوما و سرطان رحم استخراج شد. برای تعیین حضور HPV در نمونه بیمار از پرایمر MY09/MY11 مخصوص ژن کپسید L1 با توالی مشخص‌شده زیر استفاده شد:

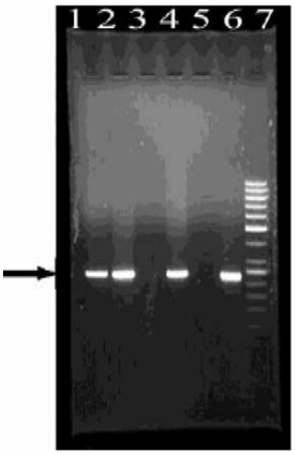
Forward: 5’-CGTCCMANNGGASACTGATC-3’
Reverse: 5’-GCMCAGGGSCATAKAATG-3’
C/A=M G/A=N T/A=S T/C=K

با کمک پرایمر اختصاصی L1 کپسیدی ویروس و با رعایت دماهای مراحل مختلف PCR در دستگاه ترموسایکلر، دمای واسرشتی ۹۵°C، اتصال پرایمر ۵۶°C و دمای تکثیر ۷۲°C، طی ۳۵ سیکل و پس از الکتروفورز در ژل آگاروز ۲% ران شد. پس از این مرحله نمونه‌های دارای DNA ویروس HPV برای انجام تایپینگ با کیت مخصوص (DNA-Technology JSC, 115478؛ مسکو؛ روسیه) بر پایه PCR انتخاب شدند. مخلوط واکنش به‌صورت آماده و جداگانه در میکروتیوب‌ها که به آن ۱۰میکرولیتر بافر و همان مقدار نیز مخلوط واکنش و ۵میکرولیتر نمونه یا کنترل مثبت یا داخلی افزوده شد. براساس دستور کیت در ۴۵ سیکل با دماهای واسرشتی ۹۴°C، اتصال پرایمر ۶۴°C و دمای تکثیر ۷۰°C، واکنش

PCR انجام شد و در نهایت محصول توسط ژل آگاروز ۲% با رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌بروماید مشاهده و براساس دستور کیت تفسیر شد. پس از آن نمونه‌های مثبت با کمک ژل پلی‌آکریل‌آمید برای نوع ۱۸ و برخی به‌روش PCR در زمان واقعی (Real time PCR) تفکیک شد و در نهایت تیپ آنها تعیین و براساس نوع ضایعه طبقه‌بندی شدند.

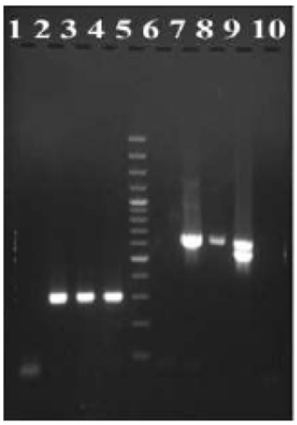
یافته‌ها

وجود باند ۴۵۰جفت‌بازی، نشانه حضور HPV در نمونه بود (شکل ۱).



شکل ۱) نمونه باندهای حاصل پس از PCR روی ژل آگارز ۲% مربوط به نمونه‌های مثبت، منفی HPV و کنترل آنها (۱، ۲، ۴) نمونه مثبت، ۵)کنترل منفی، ۶) کنترل مثبت، ۷) مارکر ۱۰۰جفت‌بازی)

ظهور باند ۵۷۰جفت‌بازی، نشانه حضور HPV تیپ ۳۳، ۵۸ یا ۶۷ و حضور باند ۶۴۲جفت‌بازی، نشانه حضور تیپ‌های ۱۶، ۳۱، ۳۵ یا H ۳۵ یا ۵۲ بودند. همچنین باندهای سایز ۲۸۵، ۲۹۱، ۲۹۴ و ۲۹۷جفت‌بازی به‌ترتیب HPV تیپ ۱۸، ۴۵، ۳۹ و ۵۹ بودند (شکل ۲).



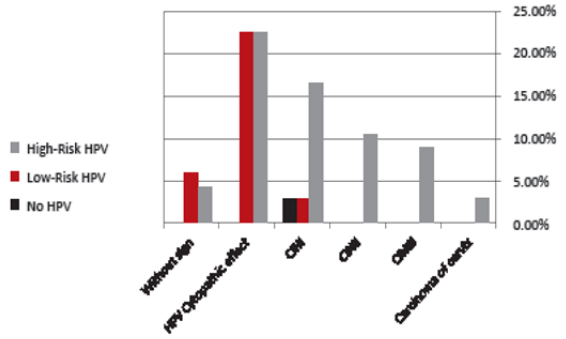
شکل ۲) نمونه باندهای حاصل از PCR روی ژل آگارز ۲% (برای گروه ۱۸: ۱) کنترل منفی، ۲) کنترل مثبت، ۳ و ۴)نمونه مثبت، ۵) مارکر ۱۰۰جفت‌بازی برای گروه ۱۶: ۶) نمونه منفی، ۷ و ۸) نمونه مثبت، ۹) کنترل مثبت، ۱۰) کنترل منفی)

از بین نمونه‌های بیمار دارای ضایعه، ویروس در ۲ نمونه (۳/۰%) با وجود علایم بالینی ضایعه درون‌اپی‌تلیالی و اثرات تغییر سلول‌های اپی‌تلیال به‌دست نیامد. بنابراین از ۶۷ مورد، ۶۵ نمونه مثبت (۹۷/۰%) از نظر HPV بودند.

۲ بیمار دارای کارسینومای رحم با دو تیپ پرخطر به‌صورت توام آلوده و ۷ مورد ضایعات شدید اپی‌تلیالی، همگی واجد ویروس با تیپ‌های پرخطر بودند. همچنین از بیماران واجد ضایعه درون‌اپی‌تلیالی فقط ۲ مورد آلوده به تیپ‌های کم‌خطر بوده و بقیه پرخطر بودند. ۳۰ بیمار (۴۴/۸%) واجد علایم سلولی بودند که در بررسی مولکولی نیمی از آنها به تیپ ویروسی پرخطر و نیمی دیگر به تیپ‌های کم‌خطر آلوده بودند. از نظر سیتولوژی ۷ نمونه (۱۰/۴%) فاقد علایم بالینی و در مجموع ۴۴ نمونه (۶۵/۷%) با ویروس تیپ‌های پرخطر آلوده بودند (جدول ۱؛ نمودار ۱).

جدول ۱) فراوانی مطلق و نسبی (اعداد داخل پرانتز درصد هستند) ضایعات دهانه رحم و ارتباط با تیپ ویروس (پرخطر وکم‌خطر)

ضایعات	High-Risk HPV	Low-Risk HPV	HPV (neg)	مجموع
Carcinoma of Cervix	۲ (۳/۰)	۰	۰	۲ (۳/۰)
CINIII	۶ (۹/۰)	۰	۰	۶ (۹/۰)
CINII	۷ (۱۰/۴)	۰	۰	۷ (۱۰/۴)
CINI	۱۱ (۱۶/۴)	۲ (۳/۰)	۲ (۳/۰)	۱۵ (۲۲/۴)
HPV Cytopathic Effect	۱۵ (۲۲/۴)	۱۵ (۲۲/۴)	۰	۳۰ (۴۴/۸)
Without Sign	۳ (۴/۴)	۴ (۶/۰)	۰	۷ (۱۰/۴)
جمع	۴۴ (۶۵/۶)	۲۱ (۳۱/۴)	۲ (۳/۰)	۶۷ (۱۰۰/۰)



نمودار ۱) ارتباط ضایعات دهانه رحم با تیپ‌های ویروس پرخطر و کم‌خطر

بیشترین موارد آلودگی مربوط به تیپ ۱۶ ویروس بود. در میان نمونه‌ها، تعداد قابل ملاحظه‌ای ویروس HPV تیپ ۱۸ و سپس انواع ۵۲، ۳۹، ۳۳ و ۳۱ مشاهده شد. همچنین در ۲ نمونه کارسینومای رحم، آلودگی توام با دو تیپ ویروسی، یک مورد با تیپ ۱۶ و ۳۱ و دیگری ۱۸ و ۳۳ دیده شد.

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی وضعیت حضور ویروس پاپیلومای انسانی در نمونه بیماران ایرانی و رابطه نوع ویروس (کم‌خطر و پرخطر) با ضایعات دهانه رحم با روش‌های مولکولی و بر پایه PCR نمونه ویروس انجام شد. این پژوهش نشان داد، در حدود ۹۷% علایم درون‌اپی‌تلیالی در سیتولوژی دهانه رحم با وجود ویروس پاپیلوما ارتباط داشتند و همچنین بیشترین تعداد ویروس در مخاط دهانه رحم از انواع پرخطر بود. پس از تایپینگ مشاهده شد که بیشترین موارد آلودگی مربوط به تیپ ۱۶ ویروس بوده است. می‌توان ویروس پاپیلومای انسانی را مسئول اصلی علایم تغییرات سلول‌های دهانه رحم دانست که بالقوه قابلیت ایجاد سرطان را دارد

و در اکثر موارد عامل اصلی در آلودگی مخاط رحم و نواحی آنوژنیتال به‌ویژه در موارد ضایعات پیش‌سرطانی و سرطانی، تیپ‌های پرخطر ویروس است. در میان نمونه‌ها تعداد قابل ملاحظه‌ای ویروس HPV تیپ ۱۸ و سپس انواع ۵۲، ۳۹، ۳۳ و ۳۱ مشاهده شد. در دو مورد نمونه کارسینومای رحم آلودگی توام با دو تیپ ویروسی مشاهده شد که در یکی تیپ ۱۶ و ۳۱ در دیگری ۱۸ و ۳۳ دیده شد. در ۷ مورد ضایعات شدید اپی‌تلیالی همگی واجد ویروس با تیپ‌های پرخطر بودند. بنابراین ارتباط تیپ ویروس با پیشرفت ضایعه به‌خوبی در نتایج قابل مشاهده است.

در پژوهش‌های مشابه، بررسی روی نئوپلازی درون‌اپی‌تلیالی رحم (CIN III) با روش هیبریداسیون درجا روی یک مورد عفونت همزمان با تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ دیده شد که عفونت HPV را مهم‌ترین مسئول در رابطه علت و معلولی تغییرات بدخیمی پیشنهاد می‌کند و این دو تیپ به‌طور همزمان موجب آلودگی در سلول‌های اسکواموس اپی‌تلیلوم دهانه رحم می‌شوند[7]. از آنجایی که عفونت پایدار با انواع سرطان‌زای ویروس به نئوپلازی یا ضایعات HSIL منتهی می‌شود، تعیین HPV-DNA می‌تواند به‌عنوان یک مارکر برای عفونت موجود یا پیشرفت ضایعات در آینده به‌کار برده شود[8].

در پژوهش حاضر، همانند پژوهش‌های مشابه توسط *گرلند* و *تبریزی*[8]، مشاهده شد که آزمایش HPV-DNA حساسیت بالاتری از نظر تشخیص ویروس برای پیش‌آگهی ضایعات پیش‌سرطانی (LSIL, HSIL) نسبت به سیتولوژی دارد.

در پژوهش حاضر ۵ مورد از ۱۲۵ بیمار واجد زخم دهانه رحم، HPV-DNA مثبت بودند، بنابراین نمی‌توان گفت که زخم دهانه رحم علامت خاصی برای عفونت HPV است. در نهایت تلفیق آزمایش پاپ‌اسمیر با آزمایش HPV-DNA می‌تواند موجب کاهش فواصل آزمایش پاپ‌اسمیر، در گروهی که HPV-DNA منفی بودند و نتیجه آزمایش سیتولوژی پاپ‌اسمیرشان نیز نرمال بوده، شود و در نتیجه مقرون به‌صرفه‌تر خواهد بود[8].

براساس پژوهش‌های مقایسه‌ای برای روش‌های تکثیر و هیبریداسیون مشخص شد PCR برای تعیین CIN، ۸۳/۳۳% نسبت به Tur e Hybrid Cap با ۶۶/۶۷%، برای شناسایی این ویروس، حساس‌تر است [9, 10].

در یک آنالیز حساسیت برای تعیین ضایعات شدید، مشخص شد که روش Hybrid Capture در تشخیص تعداد زیادی از موارد در مقایسه با روش PCR ناتوان است[11, 12]. در ۱۲ مورد از CIN، ۱۰ مورد (۸۳/۳۳%) با روش PCR مثبت شدند. در ۷ مورد از CIN II و CINIII همگی با این روش مثبت شدند. ۶ مورد ویروس پاپیلومای تیپ ۱۶ و ۱۸ و یک مورد فقط تیپ ۱۶ به‌دست آمد[11]. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش با پژوهش حاضر، همخوانی دارد. تکرار این گونه پژوهش‌ها با نمونه‌های بیشتر و روش‌های مختلف مولکولی برای کسب نتایج دقیق‌تر در امر تشخیص توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

۹۷% علایم درون‌اپی‌تلیالی در سیتولوژی دهانه رحم با وجود ویروس پاپیلومای انسانی ارتباط دارد و بیشترین تعداد ویروس در مخاط دهانه رحم از انواع پرخطر است. همچنین شایع‌ترین تیپ ویروسی آلوده‌کننده اپی‌تلیال دهانه رحم، ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ است.

تشکر و قدردانی: از همکاران آزمایشگاه جنرال بیمارستان صارم تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: موردی وجود نداشته است.

منابع مالی: توسط پژوهشکده سلولی- مولکولی و سلول‌های بنیادی تامین شده است.

سهم نویسندگان: معصومه حسنی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/ تحلیل‌گر آماری/ نگارنده بحث (۴۰%)؛ پیروز صالحیان (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۴۰%)؛ شاهین پورآذر (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/ تحلیل‌گر آماری (۲۰%)

منابع

1- Karimi N. Treatment of Condyloma acuminatum with krayotherapy [Dissertation]. Kermanshah: Kermanshah Medical Science University; 1995.

2- Malloy C, Sherris J, Herdman C. HPV DNA testing: Technical and programmatic issues for cervical cancer prevention in low-resource settings [Internet]. Semantic Scholar: 2015 [updated 2000 Dec 1; cited 2001 Dec 2]. Avilable from: https://goo.gl/7VKtgJ.

3- Definitions & Characteristics of HPV: Merck Medicos Modules; 2006.

4- James WD, Berger T, Dirk M. Andrews' Diseases of the Skin. 9th edition. Philadelphia: Saunders; 2000.

5- 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.

6- Nasiri S, Ghalamkarpoor F, Saberi A, Parvaneh V. Study of human papilloma virus in anogenital condylomas by PCR method. Iran J Clin Infect Dis. 2008;3(1):19-23.

7- Park JS, Namkoong SE, Lee JM, Kim EJ, Chee YH, Han GT, et al. Cervical intraepithelial neoplasia 3, coinfected with HPV-16 and -18 -case report. J Korean Med Sci. 1993;8(2):162–5.

8- Garland SM, Tabrizi S. Methods for HPV detection: Polymerase chain reaction assays. In: Monsonego J, editor. Emerging issues on HPV infections: From science to practice. Switzerland: Karger; 2006. pp. 63-72.

9- Sterling JC, Kurtz JB. Viral infections. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM. Textbook of Dermatology. 8th Edition. London: Blackwell Science; 1998. pp. 995-1095.

10- Solomon D, Schiffman M, Tarone R, ALTS Study group. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: Baseline results from a randomized trial. J Natl Cancer Inst. 2001;93(4):293-9.

11- Cope JU, Hildesheim A, Schiffman MH, Manos MM, Lörincz AT, Burk RD, et al. Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. J Clin Microbiol. 1997;35(9):2262-5.

12- Nomelini RS, Barcelos AC, Michelin MA, Adad SJ, Murta EF. Utilization of human papillomavirus testing for cervical cancer prevention in a university hospital. Cad Saude Publica. 2007;23(6):1309-18.