



## بررسی رابطه‌ی سن و عفونت چندگانه ویروس پاپیلومای انسانی با پیشروی وخامت ضایعات پیش سرطانی در غربالگری سرطان دهانه‌ی رحم

میترا معین‌زاده: دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

ID **بابک خیرخواه:** استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران (\* نویسنده مسئول) [babakkheirkhah@yahoo.com](mailto:babakkheirkhah@yahoo.com)

**کیومرث امینی:** دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

سرطان دهانه رحم،  
ویروس پاپیلومای انسانی،  
ژنوتایپینگ،  
ضایعات پیش‌سرطانی

**زمینه و هدف:** سرطان دهانه‌ی رحم از شایع‌ترین سرطان‌های زنان در سرتاسر دنیا بویژه آسیا است. عفونت‌های ویروسی علت یک ششم سرطان‌های انسانی هستند از جمله انواع خاصی از ویروس پاپیلومای انسانی که نقش اصلی را در ایجاد سرطان دهانه رحم دارند. این مطالعه با هدف تعیین ژنوتایپ‌های ویروس پاپیلومای انسانی و بررسی رابطه‌ی فاکتورهای دخیل در پیشروی وخامت ضایعات در نمونه‌های با سیتولوژی غیرطبیعی دهانه رحم انجام شد.

**روش کار:** در یک بازه زمانی شش ماهه در مجموع ۱۱۰ نمونه‌ی پاپ اسمیر مایع دهانه رحم با نتایج سیتولوژیک و هیستولوژیک غیرطبیعی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جمع‌آوری شد و بمنظور بررسی عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی مورد آزمایش قرار گرفتند. تعیین ژنوتایپ با کیت اختصاصی صورت گرفت. توزیع عفونت‌های چندگانه و سن زنان با آمار توصیفی ارائه گردید و در نهایت رابطه‌ی فاکتورهای سن و تعدد عفونت‌های HPV بر پیشروی وخامت ضایعات در زنان با استفاده از آزمون‌های آماری مرتبط در نرم‌افزار SPSS 23 مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در مطالعه‌ی توصیفی - مقطعی حاضر عفونت HPV در تمامی افراد مورد مطالعه تشخیص داده شد. بررسی اثر سن بر وی درجه وخامت ضایعات حاکی از معنی‌دار بودن رابطه‌ی بین افزایش سن و پیشروی درجه وخامت ضایعات بود. از طرف دیگر پژوهش حاضر رابطه‌ی معنی‌داری بین عفونت چندگانه و افزایش درجه وخامت و همچنین اثر تعاملی سن و عفونت چندگانه HPV و افزایش درجه وخامت ضایعات نشان نداد.

**نتیجه‌گیری:** در نمونه‌های سیتولوژی مایع دهانه رحم ژنوتایپ‌های متعددی قابل تشخیص هستند. ژنوتایپ‌های ۱۶، ۵۳ و ۳۱ فراوان‌ترین ژنوتایپ‌ها هستند که هر سه از انواع پرخطر و سرطان‌زا می‌باشند. عفونت چندگانه با ویروس پاپیلومای انسانی در نمونه‌های سیتولوژی مایع دهانه رحم افراد HPV مثبت، بویژه افراد با ضایعات وخیم‌تر شایع است.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Moeinzadeh M, Kheirkhah B, Amini K. Evaluation of the Relationship between Age and Human Papillomavirus Multi-Type Infection with the Severity of Precancerous Lesions in Cervical Cancer Screening. Razi J Med Sci. 2024(17 Mar);30.210.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) صورت گرفته است.

## Evaluation of the Relationship between Age and Human Papillomavirus Multi-Type Infection with the Severity of Precancerous Lesions in Cervical Cancer Screening

**Mitra Moeinzadeh:** PhD Student, Department of Biology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran

**Babak Kheirkhah:** Assistant Professor, Department of Biology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran. Baft Branch, Islamic Azad University, Baft, Iran (\* Corresponding Author) Babakkheirkhah@yahoo.com

**Kumarss Amini:** Associate Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Cervical cancer is the second most common cancer among women worldwide. Annually more than half of all new cases occur in Asia, and about 80 percent of all cases are detected in developing countries (1-3). Viral infections are the cause of one-sixth of human cancers, including certain types of human papillomavirus, which play a major role in the development of almost all cervical cancers (4). Recent studies on the prevalence of HPV in Iran have shown that HPV16 along with genotypes 18, 31, and 53 are the most common genotypes in the female population. These studies have confirmed that the presence of high-risk and carcinogenic genotypes as well as multi-type infections are common among patients, which may be associated with an increased risk of cancer progression (5-10).

Since the effects of age and multiple HPV infections on the progression of lesions are more important than other risk factors in invasive cancers (11). The aim of this study was to determine the distribution of the human papillomavirus genotypes. The relationship between age and multiple HPV infections as well as the interaction of these two important parameters in the progression of lesion deterioration in women with abnormal cervical cytology result was investigated in order to understand the role of these factors in the incidence of invasive cervical cancer and providing effective and preventing actions.

**Methods:** In a period of six months, a total of 110 women with abnormal cytological and histological results of cervical liquid smear samples were collected. Cytopathologic characterization was categorized by the Bethesda 2014, a global system for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic findings including atypical squamous cell of unknown significance (ASCUS), low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (ACA). In the present study, cytology results of ASCUS were considered abnormal. Genomic DNA from cervicovaginal liquid-based ThinPrep samples was extracted using the DNA Extraction Kit. The purity of the extracted DNA was evaluated by a NanoDrop spectrophotometer. The PCR assay for the  $\beta$ -globin gene was carried out as an internal control for each sample. Samples with positive results of  $\beta$ -globin were then amplified in PCR assay with general consensus GP5+/GP6+ primers, subsequently genotyping analysis of different HPV types was performed using INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp assay. The relationship between age and the multiplicity of HPV infections on the progression and deterioration of lesions were analyzed using statistical tests in SPSS 23.

### Keywords

Cervical cancer,  
Human papillomavirus,  
HPV genotyping,  
Precancerous lesions

Received: 05/08/2023

Published: 14/03/2024

**Results:** In the present cross-sectional study, all subjects had an infection with at least one human papillomavirus genotype. A total of 27 different genotypes were identified in the sample population, including 18 high-risk and 6 low-risk HPV genotypes.

Among all 110 samples, 74 patients (67.3%) had ASCUS cytology results, 24 patients had LSIL results (21.8%) and 12 Patients had HSIL results (10.9%). 52 out of 110 patients, had one type of HPV infection (47.3%) and 58 patients were co-infected with several different HPV genotypes (52.7%).

The mean age of all subjects was 36.2 years. The minimum age was 22 and the maximum age was 50 years. The mean age of women with ASCUS lesions was 35.9 years, 36.4 years in women with LSIL results, and 37.7 years in women with HSIL results.

A significant relationship observed between aging and the progression of the severity of the lesions. On the other hand, the present study did not show a significant relationship between multi-type HPV infections and increased severity, as well as the cooperative relation of age and multi-type HPV infections with increased severity of lesions.

**Conclusion:** Iran has a population of 25 million women over the age of 15 who are at risk for cervical cancer. The prevalence of cervical cancer in Iran is 6.64% and this cancer accounts for 34.2% of all cases of female cancer in Iran(12).

Nearly a decade interval between HPV infection and invasive cervical cancer incidence provides a golden opportunity for women to prevent the progression of precancerous lesions with early diagnosis and effective treatments(13). Significant relationship between age and increasing the severity of lesions, proves that lack of general awareness of cancer screening and timely detection among young women will lead to progression of invasive cancer, which could have been easily prevented. According to the results of the present study, HPV infection has 100% prevalent among women with dysplastic lesions and all 18 high-risk HPV genotypes that could be identified by the relevant test were observed in the sample population. Multi-type HPV infections are common in cervical liquid samples of HPV-positive individuals, especially in women with severe intraepithelial lesions.

Rates of HPV infection and the incidence of cervical cancer in developing countries remain high, therefore, it is necessary to optimize HPV DNA-based diagnostic tests at lower costs so that they can be performed with routine Pap smear tests. With regular screening, HPV diagnostic testing, and considering the age factor and the type of HPV infection in terms of risk factors of carcinogenesis, it is possible to prevent the progression of cervical cancer by providing appropriate health services for all women (14).

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Moeinzadeh M, Kheirkhah B, Amini K. Evaluation of the Relationship between Age and Human Papillomavirus Multi-Type Infection with the Severity of Precancerous Lesions in Cervical Cancer Screening. Razi J Med Sci. 2024(17 Mar);30.210.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**\*This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.**

## مقدمه

سرطان دهانه‌ی رحم دومین سرطان شایع در میان زنان در سراسر جهان است. سالانه بیش از نیمی از موارد جدید ابتلا به این سرطان در آسیا رخ می‌دهد و حدود ۸۰ درصد از کل موارد ابتلا منحصر به کشورهای در حال توسعه است (۱-۳). ۸۰ تا ۹۰ درصد سرطان‌های دهانه‌ی رحم از محل سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی آغاز می‌شود (۱۵). یک ششم همگی سرطان‌ها به وسیله عوامل عفونی و التهاب ایجاد می‌شوند (۱۶). عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی یا HPV (Human Papilloma Virus) در ایجاد تقریباً تمام سرطان‌های دهانه‌ی رحم نقش اصلی را دارد (۴). آغازگر توسعه و گسترش سرطان دهانه‌ی رحم، عفونت پایدار با ویروس پاپیلومای انسانی است که منجر به نئوپلازی با درجه‌ی بالای سلول‌های اپی‌تلیالی دهانه‌ی رحم می‌شود (۱۷). ویروس پاپیلومای انسانی رایج‌ترین پاتوژن منتقل شونده به روش جنسی در میان زنان است (۱۸) و بنظر می‌رسد در حال حاضر بهترین راه پیشگیری از سرطان دهانه رحم انجام منظم غربالگری سیتولوژیک و در صورت لزوم درمان موارد ضایعات پیش سرطانی است (۵).

مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری (Centers for Disease Control and Prevention) تخمین می‌زند که به ترتیب بیش از ۹۰ و ۸۰ درصد از مردان و زنانی که از لحاظ جنسی فعال هستند در مقاطعی از زندگی خود حداقل به یک نوع از عفونت HPV مبتلا می‌شود (۱۹). قرار گرفتن طولانی مدت در معرض عوامل عفونی ویژه، یعنی گروهی که باعث التهاب مزمن می‌شوند، می‌توانند منجر به سرطان شود (۲۰). روند طبیعی سرطان دهانه رحم شامل تغییرات برگشت ناپذیر در بافت دهانه رحم از یک حالت عادی (که در آن هیچ تغییر نورویسی یا نئوپلاستیک در اپیتلیوم سنگفرشی مشاهده نمی‌شود)، به حالت‌های مختلف ناهنجاری‌های سلولی (بدخیمی داخل اپی‌تلیالی دهانه رحم Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) با درجات مختلف) است که در نهایت منجر به سرطان تهاجمی دهانه رحم می‌شوند (۱۸). رویکردهای اخیر براساس سیستم‌های تشخیص سلولی دو زیرگروه با خصوصیات مجزا را برای دسته‌بندی یافته‌های سلول

شناسی دهانه رحم، تحت عنوان «آسیب‌های سلول‌های داخل اپی‌تلیالی سنگفرشی با درجه پایین یا Low grade squamous intraepithelial (LSIL)» و «آسیب‌های سلول‌های داخل اپی‌تلیالی سنگفرشی با درجه بالا یا High grade (HSIL)» معرفی کرده است. که براساس مقایسه‌ی صورت گرفته توسط سازمان بهداشت جهانی LSIL معادل CIN1 و HSIL معادل CIN2,3 است (۲۱). این تغییرات به ویژه در زنان جوان به دلیل پاسخ ایمنی مؤثر و تغییر و تبدیل جایگزینی سریع سلول‌های ناحیه‌ی دهانه‌ی رحم عموماً برگشت پذیر بوده و سلول‌ها به حالت عادی باز می‌گردند. ضایعات داخل اپی‌تلیالی سنگفرشی با درجه پایین (LSILs) ممکن است به SIL‌های درجه بالا (HSILs) و سرطان تهاجمی دهانه رحم پیش بروند یا ممکن است به حالت عادی بازگردند. حدود ۶۰ درصد از بدخیمی‌های درجه یک داخل اپی‌تلیالی سلول‌های دهانه‌ی رحم (CIN-1) بعد از یکسال به حالت عادی باز می‌گردند. زنان مبتلا به بدخیمی‌های درجه‌ی ۲ و ۳ در معرض خطر ابتلا به سرطان تهاجمی هستند، ولی با این وجود زمان متوسط پیشرفت بیماری هنوز چندین سال است. بنابراین زنان مبتلا به بدخیمی‌های درجه‌ی ۲ و ۳ (CIN2/3) باید معالجه شوند. (موارد استثناء در این بین، زنان ۲۰ تا ۲۴ ساله و زنان باردار هستند) (۲۲). عواملی مانند عفونت با انواع مختلف ویروس HPV، حاملگی‌های متعدد، نقص سیستم ایمنی و استفاده طولانی مدت از قرص‌های ضدبارداری خوراکی می‌تواند ریسک تبدیل ضایعات پیش سرطانی به سرطان تهاجمی را افزایش دهد (۱۷).

مطالعاتی که در سال‌های گذشته پیرامون شیوع و گسترش ویروس HPV در ایران انجام شده نشان می‌دهد که HPV شماره ۱۶ به همراه ژنوتایپ‌های ۱۸، ۳۱ و ۵۳ شایع‌ترین ژنوتایپ‌ها در جمعیت زنان کشورمان است. همچنین این مطالعات نشان می‌دهد درصد ژنوتایپ‌های پرخطر و سرطاناتزا و همچنین حضور چندین ژنوتایپ HPV در میان مبتلایان شایع است که می‌تواند با افزایش خطر پیشرفت بیماری مرتبط باشد (۵-۱۰).

بنظر می‌رسد علل اصلی پیشروی سرطان، آلودگی

مکرر و پایدار در سلول‌های اپی‌تلیالی پایه‌ای با حداقل یکی از انواع پرخطر ویروس در طی چند سال است (۲۳). لازم به ذکر است که مطالعات زیادی در نقاط مختلف جهان از جمله چین، استرالیا و ایالات متحده رابطه‌ی مستقیم و معنی‌داری را بین عفونت همزمان با چندین ژنوتایپ مختلف ویروس HPV (Multiple infection) و افزایش پیشروی ضایعات CIN و سرطان تهاجمی دهانه‌ی رحم را نشان داده است (۱۱، ۲۴، ۲۵). همچنین شیوع HPV و سرطان دهانه‌ی رحم در زنان می‌تواند با سن مرتبط باشد. براساس گزارشات بیماران سرپایی مراکز زنان و زایمان، در ۱۰ سال گذشته شیوع عفونت HPV در بین زنان ۲۰ تا ۲۴ سال افزایش چشمگیری داشته است (۲۶، ۲۷).

شناخت عوامل خطر و میزان تأثیر آن‌ها بر روند سرطانزایی می‌تواند تا حد زیادی از بروز و مرگ ناشی از این سرطان در جمعیت زنان جلوگیری کند. از آنجایی که دو عامل سن و عفونت‌های چندگانه با ویروس HPV، از سایر فاکتورهای دخیل در پیشروی سرطان تهاجمی بیشتر مورد توجه‌اند (۱۱)، این مطالعه با هدف تعیین ژنوتایپ‌ها و توزیع انواع مختلف ویروس پاپیلومای انسانی و بررسی رابطه‌ی دو فاکتور سن و عفونت متعدد HPV و اثرات متقابل این دو پارامتر در پیشروی وخامت ضایعات در نمونه‌های با سیتولوژی غیرطبیعی دهانه رحم بمنظور کمک به فهم عوامل دخیل در بروز سرطان تهاجمی و فراهم آوردن اقدامات پیشگیرانه صورت گرفت.

## روش کار

مجموعاً ۱۱۰ زن در محدوده‌ی سنی ۲۰ تا ۵۰ سال که از نظر جنسی فعال بودند و با توصیه‌ی پزشک زنان برای تجزیه و تحلیل آزمایش پاپ اسمیر در فاصله‌ی زمانی فروردین تا شهریور سال ۱۳۹۶ به آزمایشگاه‌های پاتوبیولوژی واقع در شهر تهران مراجعه کرده بودند با امضای برگه‌ی رضایت آگاهانه، در مطالعه‌ی توصیفی-مقطعی حاضر مورد بررسی قرار گرفتند. مجموعاً سه گروه از زنان از این مطالعه کنار گذاشته شدند، شامل زنان باردار، زنان بالای ۵۰ سال، و کلیه زنانی که سابقه‌ی هر گونه حراحی در ناحیه اندام تولید مثلی داشتند. نمونه‌های پاپ اسمیر لیکوئید که توسط پزشکان زنان و

زایمان و پرستاران به روش Thin prep جمع‌آوری و بمنظور تعیین درجه و میزان آسیب و بدخیمی‌های ناحیه سرویکس به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی تحت نظارت پزشکان متخصص فرستاده شده بودند، مورد بررسی و آزمون قرار گرفتند. سلول‌های تراشیده شده‌ی دیواره‌ی رحم با استفاده از سیستم Bethesda (TBS) تشخیص داده شدند. نمونه‌ها برای تست تشخیص DNA HPV برای بررسی‌های بیشتر جدا شدند. DNA ژنومی از نمونه‌های مایع دهانه‌ی رحم با استفاده از کیت استخراج DNA DNP EX6071 ساخت شرکت سیناکلون استخراج گردید. به منظور تعیین کیفیت DNA استخراج شده ۲ میکرو-لیتر از محصول در دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ قرار داده شد. به این منظور از دستگاه نانودراپ Quantous Fluorimeter مدل Promega ساخت کشور امریکا استفاده شد.

PCR برای ژن  $\beta$  گلوبین، جهت تایید استخراج DNA از نمونه‌ها بعنوان یک کنترل داخلی برای تمام نمونه‌ها انجام شد. حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر بافر آمپلیکون، ۰/۵ میکرولیتر ۰/۴ میکرومولار) از پرایمر و ۲ میکرولیتر از DNA. محصولات حاصل از PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ در تانک حاوی بافر TBE با ولتاژ V ۱۰۰ به مدت یک ساعت قرار داده شد و نتایج بوسیله دستگاه ژل داک مشاهده گردید. و نمونه‌های مثبت  $\beta$  گلوبین، برای آنالیز + GP5+GP6 PCR با پرایمر مورد توافق جدا شدند. تمام نمونه‌ها با پرایمرهای GP تکثیر شدند (۲۸).

$\beta$ -globin: 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'

5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'

مخلوط PCR با ۲/۵ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار از هر کدام از dNTP ها، ۰/۵ میکرومولار از هر کدام از پرایمرهای GP5 + GP6 و ۰/۵ یونیت از آنزیم Taq پلیمرز تکمیل شد. تکثیر DNA طی ۴۰ چرخه انجام شد که شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال Annealing در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله‌ی گسترش Extension در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. پرایمر مورد توافق برای شناسایی DNA ی ویروس

پاپیلومای انسانی با وزن تقریبی ۱۴۰ جفت باز (۲۸)،  
: (۲۹)

GP5+ (Forward):

5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'

GP6+ (Reverse):

5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'

نرم افزار SPSS 23 استفاده شد. بررسی معنی‌داری رابطه‌ی بین افزایش سن و افزایش وخامت درجه ضایعات با استفاده از آزمون همبستگی اسپیرمن مورد بررسی قرار گرفت و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. بمنظور بررسی رابطه‌ی بین نوع عفونت (Single/Multiple) و درجه وخامت ضایعات دهانه رحمی، از آنجایی که نوع عفونت یک داده کیفی و درجه وخامت یک داده رتبه‌ای بود از آزمون کای اسکوئر استفاده شد و در پایان بمنظور بررسی اثر همزمان دو متغیر سن و نوع عفونت بر درجه وخامت ضایعات دهانه رحمی از رگرسیون چند متغیره استفاده شد.

### یافته‌ها

بررسی اسپکتروفوتومتری بیانگر میزان جذب مناسب محلول DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر یعنی در

تعیین ژنوتایپ‌های مختلف HPV با استفاده از یک کیت تعیین ژنوتایپ بر پایه‌ی روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون معکوس روی ۱۱۰ نمونه‌ی مثبت از PCR ژن L1 بوسیله‌ی پرایمرهای GP5+/GP6+ صورت گرفت. تعیین ژنوتایپ با کیت INNO-LIPA HPV Genotyping Extra II Amp بلژیک و براساس دستورالعمل کارخانه‌ای و بر پایه تفسیر بصری الگوهای استریپ کیت صورت گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل تطبیقی و توصیفی نمونه‌ها از

جدول ۱- توزیع فراوانی ابتلا به انواع ویروس پاپیلومای انسانی (براساس میزان خطر) در ضایعات مختلف دهانه رحمی

HPV	ASCUS		LSIL		HSIL		مجموع
	SINGLE	MULTIPLE	SINGLE	MULTIPLE	SINGLE	MULTIPLE	
پرخطر							
HPV-۱۶	۱۰	۸	۰	۸	۰	۰	۲۶
HPV-۵۳	۴	۱۲	۲	۴	۰	۲	۲۴
HPV-۳۱	۲	۱۴	۰	۰	۰	۶	۲۲
HPV-۵۲	۲	۱۲	۰	۲	۰	۳	۱۹
HPV-۶۶	۲	۹	۲	۲	۰	۰	۱۵
HPV-۵۸	۰	۷	۲	۲	۰	۰	۱۱
HPV-۶۲	۲	۸	۰	۰	۰	۰	۱۰
HPV-۱۸	۰	۴	۰	۱	۰	۴	۹
HPV-۷۳	۰	۶	۰	۰	۰	۲	۸
HPV-۵۱	۰	۵	۰	۰	۲	۰	۷
HPV-۳۹	۰	۲	۲	۰	۰	۲	۶
HPV-۴۵	۲	۴	۰	۰	۰	۰	۶
HPV-۵۶	۲	۱	۲	۰	۰	۰	۵
HPV-۳۵	۲	۲	۰	۰	۰	۰	۴
HPV-۶۸	۰	۲	۰	۲	۰	۰	۴
HPV-۵۹	۰	۴	۰	۰	۰	۰	۴
HPV-۳۳	۰	۴	۰	۰	۰	۰	۴
HPV-۸۲	۰	۲	۰	۰	۲	۰	۴
کم خطر							
HPV-۶	۲	۴	۲	۱	۰	۰	۹
HPV-۶۱	۰	۲	۰	۰	۰	۰	۲
HPV-۱۱	۰	۰	۲	۰	۰	۰	۲
HPV-۴۰	۰	۲	۰	۰	۰	۰	۲
HPV-۴۴	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱
HPV-۸۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱
ناشناخته							
HPV-۸۹	۲	۳	۰	۰	۰	۲	۷
HPV-۷۰	۰	۴	۰	۰	۰	۰	۴
HPV-۸۳	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۲
مجموع	۳۴	۱۲۳	۱۴	۲۲	۴	۲۱	۲۱۸
غیر قابل تشخیص							
		۰		۲		۰	۲
مجموع نهایی		۱۵۷		۲۸		۲۵	۲۲۰

محدوده‌ی ۲-۱/۸ بود که نشانگر مناسب بودن DNA استخراج شده از نمونه‌ها بود. بمنظور تعیین حضور ژنوم ویروس HPV در نمونه‌ها از تکثیر قطعه ژن بسیار حفاظت شده‌ی L1 با ست پرایمرهای اختصاصی استفاده شد که تمامی ۱۱۰ نمونه با پرایمرهای اختصاصی GP5+/GP6+ تکثیر شدند و محصول ۱۴۱ بر روی ژل آگارز، برای تمامی نمونه‌ها تایید گردید.

در تمام بیماران با درجات مختلف از بدخیمی‌های دهانه‌ی رحم یعنی در تمام ۱۱۰ نفر مورد مطالعه مشاهده شد. اطلاعات مربوط به توزیع انواع ژنوتایپ‌های HPV (بر اساس میزان خطر در سرطانی‌زایی) و نوع عفونت به تفکیک درجه ضایعات در جدول ۱ آمده است.

در مجموع ۲۷ ژنوتایپ مختلف در جمعیت زنان مورد مطالعه شناسایی شد که از این میان ۱۸ گونه پرخطر از نظر میزان سرطان‌زایی، ۶ گونه‌ی کم خطر و ۳ گونه شناسایی شده دیگر هم شامل انواعی بودند که از نظر میزان خطر در بروز انواع مشکلات و بدخیمی‌های دهانه‌ی رحمی هنوز شناخته شده نیستند (شامل ژنوتایپ‌های ۸۹، ۷۰ و ۸۳). سه ژنوتایپی که بالاترین میزان شیوع را داشتند به ترتیب ژنوتایپ‌های شماره ۱۶، ۵۳ و ۳۱ بودند.

از بین تمام زنان مورد مطالعه (۱۱۰ نفر) ۷۴ نفر (۶۷/۳٪) دارای ضایعات سلولهای سنگفرشی غیر طبیعی با علائم نامشخص Atypical Squamous Cells

of Undetermined Significance (ASCUS) ۲۴ نفر دارای ضایعات LSIL (۲۱/۸٪) و ۱۲ نفر دارای ضایعات HSIL (۱۰/۹٪) بودند. از میان ۵۲ نفر از ۱۱۰ نفر مبتلا به تنها یک نوع از عفونت HPV بودند (۴۷/۳٪) و ۵۸ نفر مبتلا به عفونت همزمان با چند ژنوتایپ مختلف ویروس HPV بودند (۵۲/۷٪). فراوانی افراد با عفونت‌های تکی و چندگانه در تمام بیماران به تفکیک درجه ضایعات رحمی در نمودار ۱ آمده است.

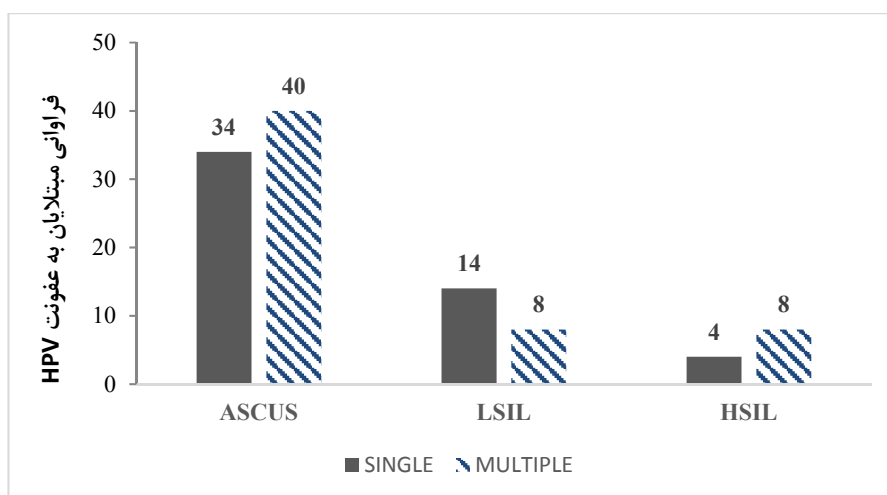
در تمام بیماران با درجات مختلف از بدخیمی‌های دهانه‌ی رحم یعنی در تمام ۱۱۰ نفر مورد مطالعه مشاهده شد. اطلاعات مربوط به توزیع انواع ژنوتایپ‌های HPV (بر اساس میزان خطر در سرطانی‌زایی) و نوع عفونت به تفکیک درجه ضایعات در جدول ۱ آمده است.

در مجموع ۲۷ ژنوتایپ مختلف در جمعیت زنان مورد مطالعه شناسایی شد که از این میان ۱۸ گونه پرخطر از نظر میزان سرطان‌زایی، ۶ گونه‌ی کم خطر و ۳ گونه شناسایی شده دیگر هم شامل انواعی بودند که از نظر میزان خطر در بروز انواع مشکلات و بدخیمی‌های دهانه‌ی رحمی هنوز شناخته شده نیستند (شامل ژنوتایپ‌های ۸۹، ۷۰ و ۸۳). سه ژنوتایپی که بالاترین میزان شیوع را داشتند به ترتیب ژنوتایپ‌های شماره ۱۶، ۵۳ و ۳۱ بودند.

از بین تمام زنان مورد مطالعه (۱۱۰ نفر) ۷۴ نفر (۶۷/۳٪) دارای ضایعات سلولهای سنگفرشی غیر طبیعی با علائم نامشخص Atypical Squamous Cells

میانگین سن کل افراد مورد مطالعه ۳۶/۲ سال بود کمترین سن ۲۲ و بیشترین سن ۵۰ سال گزارش شد. میانگین سن در افراد دارای ضایعات ASCUS ۳۵/۹، در افراد دارای ضایعات LSIL ۳۶/۴ و در افراد دارای ضایعات HSIL ۳۷/۷ سال بود.

بررسی رابطه‌ی بین فراوانی عفونت HPV و ابتلا به درجات مختلف ضایعات دهانه رحمی (در هر سه گروه نمونه‌های دارای نتایج سلول شناسی ASCUS، LSIL و HSIL) با استفاده از آزمون همبستگی اسپیرمن با میزان P-value برابر با ۰/۰۰۰ بود و با توجه به کوچکتر بودن این از سطح معنی داری رابطه (۰/۰۵)، می‌توان



نمودار ۱- فراوانی افراد با عفونت‌های تکی و چندگانه در هر یک از گروه‌های ضایعات دهانه رحمی

**جدول ۲- بررسی معنی‌داری رابطه‌ی بین افزایش سن و افزایش وخامت درجه ضایعات**

درجه وخامت	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب همبستگی	P-value
ASCUS	۷۴	۳۵/۹۲	۹/۱۵۳	۰/۱۹	۰/۰۴۵
LSIL	۲۴	۳۶/۳۸	۵/۲۶۵		
HSIL	۱۲	۳۷/۶۷	۶/۲۲۸		

آزمون استفاده شده همبستگی اسپیرمن و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

**جدول ۳- بررسی رابطه‌ی بین نوع عفونت (Single/Multiple) و درجه وخامت ضایعات دهانه رحمی**

P-value	جمع کل	وخامت بیماری			فراوانی/درصد	عفونت
		HSIL	LSIL	ASCUS		
۰/۱۹۱	۵۲	۴	۱۴	۳۴	فراوانی	SINGLE
	%۱۰۰	%۷/۷	%۲۶/۹	%۶۵/۴	درصد فراوانی	
۰/۱۹۱	۵۶	۸	۸	۴۰	فراوانی	MULTIPLE
	%۱۰۰	%۱۰۰	%۱۴/۳	%۷۱/۴	درصد فراوانی	

آزمون استفاده شده کای اسکوتر و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

**جدول ۴- بررسی اثر همزمان دو متغیر سن و نوع عفونت بر درجه وخامت ضایعات دهانه رحمی**

P-value	F مقدار آماره	میانگین مربعات	df	مجموع مربعات	منبع تغییرات
۰/۰۰۰	۸۹۴/۱۸۸	۱۹۲/۵۳۹	۱	۱۹۲/۵۳۹	مقدار ثابت
۰/۰۰۰	۶/۲۶۶	۱/۳۴۹	۲۶	۳۵/۰۷۷	سن
۰/۳۹۳	۰/۷۴۰	۰/۱۵۹	۱	۰/۱۵۹	عفونت
۰/۹۸۳	۰/۴۰۱	۰/۰۸۶	۱۸	۱/۵۵۳	سن * عفونت
		۰/۲۱۵	۶۲	۱۳/۳۵۰	خطا
			۱۰۸	۲۷۰	کل

R Squared = .735 (Adjusted R Squared = .543)

آزمون استفاده شده رگرسیون چند متغیره و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج بررسی اثر همزمان دو متغیر سن و نوع عفونت بر درجه وخامت ضایعات دهانه رحمی در جدول ۴ ارائه گردیده است. با توجه به خروجی رگرسیون P-value برای اثر تعاملی (همزمان) سن - عفونت بزرگتر از ۰/۰۵ است که نشان‌دهنده‌ی عدم تاثیر معنادار همزمان دو متغیر سن و نوع عفونت بر درجه وخامت ضایعات دهانه رحمی است.

### بحث

ایران دارای جمعیتی بالغ بر ۲۵ میلیون زن بالای ۱۵ سال است که در معرض خطر ابتلا به سرطان دهانه‌ی رحم قرار دارند. شیوع سرطان دهانه‌ی رحم در ایران ۶/۶۴ درصد است و این سرطان ۳۴/۲ درصد از کل موارد ابتلای زنان به بیماری سرطان در ایران را شامل می‌شود (۱۲). از آنجایی که نقش اساسی عفونت HPV

به‌وضوح نشان داد که بین فراوانی عفونت HPV و ابتلا به ضایعات دهانه رحمی ارتباط معنی‌داری وجود دارد. نتایج مربوط به آزمون بررسی معنی‌داری رابطه‌ی بین افزایش سن و افزایش وخامت درجه ضایعات در جدول ۲ آمده است. با توجه به نتایج آزمون همبستگی اسپیرمن و مقدار P-value برابر با ۰/۰۴۵ و کوچکتر از ۰/۰۵ است، نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری رابطه‌ی بین سن و درجه وخامت ضایعات می‌باشد.

نتایج مربوط به آزمون بررسی رابطه‌ی بین نوع عفونت (Single/Multiple) و درجه وخامت ضایعات دهانه رحمی در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج آزمون کای اسکوتر مقدار P-value برابر با ۰/۱۹۱ و بزرگتر از ۰/۰۵ است و نشان‌دهنده‌ی معنادار نبودن رابطه‌ی بین نوع عفونت و درجه وخامت ضایعات می‌باشد.



HPV در زنان با پاپ اسمیر غیرطبیعی ۳۵/۵٪ گزارش شد (۵). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط منصفی و همکارانش در کرمان صورت گرفت از ۶۲ نمونه پاپ اسمیر غیرطبیعی ۵۶٪ دارای ضایعات خفیف، ۴۲٪ ضایعات متوسط و ۲٪ هم ضایعات شدید داشتند. در مجموع ۳۹٪ افراد با پاپ اسمیر غیرطبیعی مبتلا به عفونت HPV بودند. و میانگین سنی افراد ۴۵ سال گزارش شده بود (۹).

این در حالی است که در پژوهش حاضر بروز عفونت HPV در نمونه‌های پاپ اسمیر غیرطبیعی شیوع ۱۰۰ درصدی را نشان داد.

نتایج بدست آمده از بررسی سن در نمونه‌برداری‌های انجام شده از زنان دارای ضایعات پیش سرطانی وابسته به HPV، حاکی از آن است که میانگین سن تمام شرکت‌کنندگان در هر سه دهه در میانه‌ی دهه‌ی ۳۰ سالگی است. که با داده‌های منتشر شده در ایران و سایر نقاط جهان همخوانی دارد. براساس اطلاعات جهانی، سرطان و ضایعات پیش سرطانی دهانه‌ی رحم در اکثر موارد در زنان در دهه‌ی ۳۰ و ۴۰ زندگی‌شان رخ می‌دهد (۲) و کاهش در میانگین سن افراد مبتلا به عفونت HPV و ضایعات دیسپلاستیک بطور معمول با کاهش سن شروع فعالیت‌های جنسی مرتبط است (۹). فاصله‌ی تقریباً یک دهه از زمان ابتلا به عفونت HPV تا بروز سرطان دهانه‌ی رحم، یک فرصت طلایی برای تشخیص، درمان و پیشگیری از وخامت ضایعات پیش سرطانی در اختیار زنان و حوزه سلامت قرار می‌دهد (۱۳).

وجود رابطه‌ی معنی‌دار بین سن و افزایش درجه وخامت ضایعات ثابت می‌کند که در صورت عدم آگاهی از بیماری و درمان بموقع، با افزایش سن، آسیب‌های دهانه رحمی توسعه پیدا کرده و به سمت سرطان تهاجمی پیشروی می‌کنند. از این رو تحقیقات پیرامون تفاوت در سرطان‌های دهانه رحم بین گروه‌های سنی مختلف می‌تواند در جهت دستیابی به یک راهنمای بالینی، بمنظور بررسی شیوع روزافزون سرطان دهانه رحم در زنان جوان کمک فراوانی کند (۲۶). افزایش آگاهی عمومی در خصوص اهمیت عوامل خطر، اولویت اصلی برای برنامه‌های پیشگیری و کنترل سرطان است (۳، ۳۰). که در نهایت امر با تدوین برنامه‌های

در توسعه‌ی آسیب‌های داخل اپی‌تلیالی در ناحیه‌ی دهانه‌ی رحم بوضوح ثابت شده است (۲۵). تعیین انواع ژنوتایپ‌های HPV بمنظور طراحی واکسن‌های نسل دوم، ویژه‌ی جمعیت‌های خاص، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۶). در این مطالعه نیز سعی شد که فراوان‌ترین ژنوتایپ‌های ویروسی در جمعیت زنان ایران شناسایی و معرفی شوند.

در مطالعه حاضر در مجموع ۲۷ ژنوتایپ مختلف ویروس HPV شناسایی شد از جمله ۱۸ ژنوتایپ مختلف از انواع پرخطر (از نظر میزان سرطان‌زایی)، ۶ ژنوتایپ کم‌خطر (که باعث بروز علائمی مانند زگیل‌های تناسلی می‌شوند) و ۳ ژنوتایپ که از نظر میزان خطر در سرطان‌زایی هنوز ناشناخته هستند و توافق جامعی بر سر تأثیر آنها روی ایجاد انواع ضایعات رحمی وجود ندارد.

در پژوهشی که توسط رضایی و همکارانش در سال ۲۰۱۷ صورت گرفت و به بررسی تأثیر ژنوتایپ‌های مختلف ویروس پاپیلوما بر شدت نئوپلازی دهانه رحم در بیماران پرداختند، نشان داده شد که نوع ویروس در شدت بیماری تأثیر دارد و ویروس HPV شماره ۱۶ و بدنبال آن HPV شماره ۱۸ در میان زنان دارای درجات مختلف ضایعات پیش سرطانی ژنوتایپ غالب بودند (۶). همچنین براساس مطالعه‌ای که توسط صالحی وزیری و همکارانش در سال ۲۰۱۶ میلادی در تهران صورت گرفت، شایع‌ترین ژنوتایپ‌های پرخطر در میان تمام افراد، ژنوتایپ شماره ۱۶ با ۳۲/۸٪ مورد ابتلا و بدنبال آن ژنوتایپ شماره ۵۳ با ۹/۱٪ مورد ابتلا گزارش شد. در میان نمونه‌های HPV مثبت، ۷۹/۳٪ مبتلا به انواع پرخطر ویروس و ۳۳/۳٪ بیماران مبتلا به انواع کم خطر بودند. از میان کل افراد HPV مثبت ۳۳/۸٪ دارای عفونت با ژنوتایپ‌های متعدد یا چندگانه بودند. اختلاف مدیان سن در میان درجه‌ی آسیب‌های دهانه رحمی مجزا، از لحاظ آماری معنی‌دار بود (۸).

در یک مطالعه‌ی اپیدمیولوژیک گسترده که در سال ۲۰۱۲ توسط خداکرمی و همکارانش در تهران صورت گرفت نشان داده شد که انواع پرخطر ویروس HPV در جمعیت مبتلایان از شیوع بسیار بالایی برخوردار است. میزان ابتلا در گروه سنی زیر ۲۵ سال بیشتر از سایر گروه‌ها بود و همچنین میزان ابتلا به

تشخیص نوع عفونت در برنامه‌های غربالگری و همچنین تعیین مهمترین عوامل خطر مرتبط با توسعه سرطان دهانه رحم پی برد. آنچه مسلم است نرخ ابتلا به عفونت HPV و بروز و شیوع سرطان دهانه‌ی رحم در کشورهای در حال توسعه همچنان بالاست که این امر ناشی از شرایط اقتصادی-اجتماعی پایین، عدم آگاهی عموم جمعیت و برنامه‌های غربالگری و واکسیناسیون ناکافی است (۲). از اینرو لازم است آزمایشات تشخیصی مبتنی بر DNA با هزینه‌های کمتر بهینه گردد تا بتوان آنها را با تست پاپ اسمیر بطور معمول انجام داد و در طی غربالگری منظم و کنترل عوامل خطر مرتبط، بویژه سن، با ارائه خدمات بهداشتی و درمانی مناسب از بروز و پیشروی این سرطان در بین زنان جلوگیری کرد (۱۴). پژوهش حاضر با کد (IR.KMU.REC.1398.361) به تایید کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی رسید.

## References

1. Taebi M, Riazi H, Keshavarz Z, Afrakhteh M. Knowledge and attitude toward human papillomavirus and HPV vaccination in Iranian population: a systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(7):1945.
2. Wang J, Tang D, Wang J, Zhang Z, Chen Y, Wang K, et al. Genotype distribution and prevalence of human papillomavirus among women with cervical cytological abnormalities in Xinjiang, China. *Hum Vaccines Immunother*. 2019.
3. Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human papillomavirus infection and cervical cancer: epidemiology, screening, and vaccination—review of current perspectives. *J Oncol*. 2019;2019.
4. Chinchai T, Homchan K, Sopipong W, Chansaenroj J, Swangvaree S, Junyangdikul P, et al. Lack of Associations between TNF-Polymorphisms and Cervical Cancer in Thai women. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(3):953-6.
5. Khodakarami N, Hosseini S, Yavari P, Farzaneh F, Etemad K, Salehpour S, et al. Human papillomavirus infection prevalence in women referred to health clinic of Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 2012. (Persian)
6. Rezaei S, Saadatniya G, Salehian P. Genotyping of Human Papillomavirus in Cervical Liquid-Based Cytology Specimens. *Sarem Journal of Medical Research*. 2017;2(3):165-9. (Persian)

غربالگری منظم و ارائه خدمات مربوط به واکسیناسیون موثر و بموقع (واکسیناسیون زنان با واکسن‌های چندگانه تا قبل از سن ۲۴ سالگی) قابل تحقق است (۳۱).

براساس نتایج پژوهش حاضر عفونت HPV در بین زنان داری ضایعات دیسپلاستیک شیوع ۱۰۰ درصدی داشت و تمام ۱۸ ژنوتایپ پرخطر ویروس HPV که تست مربوطه قابل به شناسایی بود در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد. عفونت چندگانه با انواع مختلف ژنوتایپ‌های ویروس شیوع بالایی در جمعیت مورد مطالعه داشت و میانگین سن زنان مبتلا به عفونت HPV و ضایعات پیش‌سرطانی نسبت به مطالعات گذشته کاهش داشت.

اگرچه درصد ابتلا به عفونت‌های چندگانه در زنان با ضایعات ASCUS و HSIL بیشتر از موارد مبتلایان به عفونت‌های تکی بود ولی نتایج حاصل از این پژوهش، ارتباط معنی‌داری بین ابتلا به عفونت چندگانه و افزایش خطر پیشروی ضایعات سلول‌های سنگفرشی درون اپی‌تلیالی را نشان نمی‌دهد، که مشابه مطالعات قبلی صورت گرفته در این خصوص در ایران است. هرچند تا کنون در سطح جهانی توافق جامعی در این خصوص بدست نیامده است (۸).

همچنین بررسی رابطه همزمان و تعاملی سن و نوع عفونت (بعنوان دو پارامتر مهم) با افزایش درجه وخامت ضایعات هم رابطه معنی‌داری را نشان نداد، که میتواند متأثر از محدودیت‌های موجود در مطالعه حاضر شامل عدم آگاهی از سایر پارامترهای دخیل در فرایند سرطان‌زایی، نظیر سن شروع فعالیت جنسی، تعداد بارداری‌ها و ابتلا به سایر بیماری‌های مقاربتی باشد. از اینرو، در خصوص نتیجه‌گیری قطعی، انجام مطالعات بیشتر با جوامع آماری بزرگتر و بازه سنی گسترده‌تر از زنان مورد مطالعه به همراه اطلاعات جامع‌تری از سبک زندگی، کیفیت سیستم ایمنی و سابقه‌ی پزشکی بیماران، ضروری است.

با تأیید قطعی این مسئله که انواع خاصی از ژنوتایپ‌های پرخطر HPV عامل اصلی سرطان دهانه رحم هستند و تشخیص و درمان سریع در سنین پایین می‌تواند از پیشروی به سمت سرطان تهاجمی پیشگیری کند، می‌توان به اهمیت و ضرورت جایگاه

7. Hamkar R, Shoja Z, Ghavami N, Heydari N, Farahmand M, Jalilvand S. Type-specific human papillomavirus prevalence in Iranian women with normal cervical cytology: the impact of current HPV vaccines. *Intervirolology*. 2018;60(4):125-30. (Persian)
8. Salehi-Vaziri M, Sadeghi F, Hashemi FS, Haeri H, Bokharaei-Salim F, Monavari SH, Keyvani H. Distribution of human papillomavirus genotypes in Iranian women according to the severity of the cervical lesion. *Iranian Red Crescent Med J*. 2016;18(4).
9. Monsefi N, Dabiri S, Abaszadeh M, Safizadeh H, Fotuhi Ardakani R, Amirpor S, et al. Frequency of dysplastic and cancerous Pap smear and genotyping of human papillomavirus by DNA probetechniques in Kerman, Iran. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*. 2013;20(5):450-9. (Persian)
10. Karimi-Zarchi M, Hajimaghsoudi N, Tabatabai A, Moghimi M, Shayestehpour M, Doosti M. Prevalence of high-risk human papillomavirus types among women screened for cervical cancer in yazd, iran, and comparison of cytology, histology, and colposcopy results. *Jundishapur J Microbiol*. 2020;13(9):1-6.
11. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am J Clin Pathol*. 2012;137(4):516-42.
12. Shobeiri F, Javad M, Parsa P, Roshanaei G. Effects of group training based on the health belief model on knowledge and behavior regarding the pap smear test in Iranian women: a quasi-experimental study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(6):2871-6.
13. Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med*. 2018;7(10):5217-36.
14. Ward EM, Sherman RL, Henley SJ, Jemal A, Siegel DA, Feuer EJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, featuring cancer in men and women age 20–49 years. *J Natl Cancer Institute*. 2019;111(12):1279-97.
15. Vesco KK, Whitlock EP, Eder M, Lin J, Burda B, Senger CA, et al. Screening for cervical cancer: a systematic evidence review for the US Preventive Services Task Force. *Lancet Oncol*. 2011;12(7):663-72.
16. Kessler TA, editor *Cervical cancer: prevention and early detection*. Seminars in oncology nursing; 2017: Elsevier.
17. Szymonowicz KA, Chen J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer Biol Med*. 2020;17(4):864.
18. Wang R, Pan W, Jin L, Huang W, Li Y, Wu D, et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Lett*. 2020;471:88-102.
19. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex Transmitt Dis*. 2014;41(11):660.
20. Pecorino L. *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*: Oxford university press; 2021.
21. Lax S. *Histopathology of cervical precursor lesions and cancer*. *Acta Dermatoven APA*. 2011;20(3):125-33.
22. Mello V, Sundstrom RK. *Cervical intraepithelial neoplasia*. *StatPearls [Internet]*: StatPearls Publishing; 2023.
23. Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci*. 2017;131(17):2201-21.
24. Crowe E, Pandeya N, Brotherton JM, Dobson AJ, Kisely S, Lambert SB, Whiteman DC. Effectiveness of quadrivalent human papillomavirus vaccine for the prevention of cervical abnormalities: case-control study nested within a population based screening programme in Australia. *BMJ*. 2014;348.
25. You W, Li S, Du R, Zheng J, Shen A. Epidemiological study of high-risk human papillomavirus infection in subjects with abnormal cytological findings in cervical cancer screening. *Experim Ther Med*. 2018;15(1):412-8.
26. Ding S, Huang X, Zhu J, Xu B, Xu L, Gu D, Zhang W. ADH7, miR-3065 and LINC01133 are associated with cervical cancer progression in different age groups. *Oncol Lett*. 2020;19(3):2326-38.
27. Luo G, Sun X, Li M, Liu T, Hu G, He Y, et al. Cervical human papillomavirus among women in Guangdong, China 2008-2017: Implication for screening and vaccination. *J Med Virol*. 2019;91(10):1856-65.
28. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol*. 2008;46(3):1050-9.
29. de Roda Husman A-M, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J General Virol*. 1995;76(4):1057-62.
30. Brianti P, De Flammineis E, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol*. 2017;40(2):80-5.
31. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. *Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases*. *Vaccine*. 2013;31:H1-H31.