دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مقایسه روش PCR و پاپ اسمیر در تشخیص ویروس پاپیلومای انسانی در زنان دارای زگیل تناسلی

حانیه باشی زاده فخار
کارشناس ارشد میکروبیولوژی،
دانشگاه‌آزاداسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان،
تنکابن، ایران

رویا فرجی
دانشیار زنان و زایمان،
دانشگاه‌علوم‌پزشکی گیلان، رشت، ایران

مسعود قانع
استادیار میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی،
تنکابن، ایران

مصطفی جعفر پور
استادیار میکروب شناسی، دانشگاه آزاداسلامی،
تنکابن، ایران

بهرنگ عاشوری زاده
دستیار تخصصی جراحی عمومی،
دانشگاه‌علوم‌پزشکی گیلان، رشت، ایران

نویسنده مسئول: حانیه باشی زاده فخار

پست الکترونیک: Haniyehfakhar@yahoo.com

تلفن:۰۹۳۶۳۰۳۱۰۴۹

آدرس: مازندران، تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان

دریافت:۹۱/۵/۱٤
ویرایش پایانی:۹۱/۹/۱٤
پذیرش:۹۱/۹/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: *مطالعات زیادی نشان داده اند که پاپیلوما ویروس نقش مهمی در ایجاد سرطان سرویکس دارد به طوری که عامل ۹۹ درصد سرطان های سرویکس در جهان معرفی شده است. تحقیقات فراوانی در مورد روش تشخیصی مناسب و غربالگری پاپیلوما ویروس در بیماران دارای زگیل تناسلی انجام شده است .هدف از این تحقیق مقایسه تکنیک ملکولی PCR و روش پاپ اسمیر در غربالگری پاپیلوما ویروس در جمعیت مورد مطالعه بوده است.*

روش بررسی: *از مهرماه ۱۳۸۹تا فروردین ماه ۱۳۹۰ ، تعداد ۴۵ نمونه سواپ واژینال و سرویکس زنان دارای زگیل تناسلی از نظر شناسایی DNA ویروس HPV با استفاده PCR اختصاصی و پاپ اسمیر تحت آزمون قرار گرفتند.*

یافته ها: *از ۴۵ نمونه سواپ واژن و سرویکس بیماران دارای زگیل تناسلی ،۳۷ نمونه (۸۲/۲٪) مثبت گزارش شد. بر اساس نمونه پاپ اسمیر از ۴۵ نمونه ۱۳ مورد (۲۹ ٪) بدخیمی و ۳۲ مورد (۷۱ ٪) طبیعی مشاهده شد.*

نتیجه گیری: *میزان شیوع عفونت ویروس HPV در زنان دارای زگیل تناسلی به روش PCR، ۸۲/۲ درصد بدست آمد. در حالیکه بر اساس آزمایش شایع غربالگری پاپ اسمیر ۲۹ درصد موارد مبتلا به دیسپلازی سرویکس ناشی از درگیری فرد با پاپیلوما ویروس بود. عدم توافق بین نتایج حاصله از PCR با پاپ اسمیر ناشی از ویژگی و حساسیت پائین روش پاپ اسمیر است. پیشنهاد می گردد جهت بهبود کیفیت غربالگری در افراد دارای زگیل تناسلی در کنار پاپ اسمیر از روش تشخیصی PCR نیز استفاده شود.*

واژه های کلیدی: *ویروس پاپیلومای انسانی، زگیل تناسلی، PCR ،پاپ اسمیر*

آدرس مقاله:
باشی زاده فخار ح، فرجی ر، قانع م، جعفر پور م، عاشوری زاده ب" مقایسه روشPCR و پاپ اسمیر در تشخیص ویروس پاپیلومای انسانی در زنان دارای زگیل تناسلی"مجله علوم آزمایشگاهی، پاییز ۱۳۹۲،دوره هفتم شماره (۳):۹-۱۵

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

زگیل های تناسلی در سرویکس درنهایت در فرد ایجاد سرطان سرویکس می نماید (۱). سرطان سرویکس دومین عامل مرگ و میر زنان گزارش شده است و عامل ایجاد زگیل در زنان ویروس پاپیلومای انسانی می باشد. هر سال حدود ۵/۵ میلیون آمریکایی دچار عفونت جدید HPV می شوند و به همین دلیل HPV شایع ترین بیماری آمیزشی (STD) اکتسابی است(۱). بر اساس گزارش ثبت سرطان در انستیتو سرطان ایران، شیوع سرطان رحم و سرویکس حدود ۶- ۷ در ۱۰۰۰۰۰ می باشد .این سرطان اغلب در سنین ۳۰ تا ۵۵ سالگی رخ می دهد، اما به تازگی گزارش های فراوانی در زنان جوان شده است (۲). علی رغم این که بیش از نیم قرن از انجام آزمایش پاپانیکولائو (Pap test) می گذرد، سرطان سرویکس هنوز یک علت مرگ وابسته به سرطان و مرگ و میر زنان در آمریکا و دیگر کشورها به شمار می رود .اجرای برنامه غربالگری با سیتولوژی، سبب کاهش قابل توجه در بروز مرگ و میر سرطان سرویکس در کشورهای پیشرفته شده است .اما در کشورهای در حال توسعه هنوز شکل پیشرفته سرطان سرویکس دیده می شود(۳). هدف از انجام غربالگری با سیتولوژی سرویکس، تشخیص سرطان و ضایعات پیش زمینه آن می باشد (۴). علی رغم موفقیت بررسی های غربالگری در سطح وسیع، انجام غربالگری با سیتولوژی ارزش محدودی دارد. حساسیت این روش بین ۳۰ تا ۸۷ درصد و ویژگی آن بین ۶۸ تا ۱۰۰ درصد می باشد (۵). علت متغیر بودن حساسیت و ویژگی روش سیتولوژی، وجود ضایعات کوچک سرویکس، نمونه نامناسب، آلوده شدن نمونه با خون و ترشحات می باشد. متاسفانه پاپ اسمیردر مراحل اولیه درگیری فرد با ویروس امکان قابلیت تشخیص ویروس را ندارد(۶). به دلیل پایین بودن حساسیت آزمایش پاپ اسمیر روش های دیگری از جمله روش سیتولوژی غوطه ور در مایع Liquid Based Cytology (LBC) و یا انجام آزمایش DNA ویروس HPV (HPV PCR) به عنوان ابزاری برای غربالگری سرطان و یا پیگیری نتایج غیرطبیعی پاپ اسمیر رواج یافته است (۴). متاآنالیزهای انجام شده در مورد روش ملکولی PCR نشان داده است که آزمایش PCR حساس تر از روش سیتولوژی است اما کمتر اختصاصی می باشد. حساسیت تشخیص بیماری های با روش HPV PCR ۸۵ درصد و ویژگی ۸۴ درصد است در حالی که در روش سیتولوژی، حساسیت ۶۰ درصد و اختصاصیت ۹۵ درصد است(۸-۷). طبق توصیه های انجمن زنان و مامایی و انجمن سرطان زنان آمریکا، آزمایش HPV PCR به همراه آزمایش سیتولوژی سرویکس می تواند به عنوان روش غربالگری به کار رود ولی در زنان ۳۰ سال و بیشتر، اگر این دو آزمایش منفی باشند، می توان فاصله غربالگری را به هر سه سال افزایش داد، زیرا حساسیت این آزمایش ها بالا و ارزش تشخیص آنها قابل قبول است(۹). حدود ۹۰ درصد سرطان دهانه سرویکس در زنان به علت درگیری فرد با ۱۳ سروتیپ شایع HPV گزارش شده است(۱۰). تعیین وجود ویروس HPV در پیشگیری به موقع افراد از سرطان سرویکس و درمان افراد دارای زگیل نقش به سزایی دارد، هدف از این مطالعه بررسی زنان دارای زگیل تناسلی به دو روش پاپ اسمیر و روش PCR و مقایسه این دو روش در تشخیص ویروس پاپیلوما می باشد. نتایج این مطالعه می تواند فرآیند پیشگیری، تشخیص به موقع و درمان کار آمد سرطان گردن رحم کمک موثری نماید.

روش بررسی

در این بررسی ۴۵ زن دارای زگیل تناسلی که به درمانگاه الزهرا رشت جهت معاینه واژینال در طی مهر ۱۳۸۹ لغایت فروردین ۱۳۹۰ مراجعه نموده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. روش کار مطالعه مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه قرار گرفت و کلیه بانوان با رضایت آگاهانه پس از تکمیل پرسشنامه، در این مطالعه شرکت نمودند. نمونه برداری توسط پزشک معالج با استفاده از سواپ استریل از ترشحات واژن و سرویکس هربیمار و تحت شرایط استریل صورت گرفت. نمونه ها به دو بخش

Archive of SID

www.SID.ir

تقسیم شدند، یک بخش با استفاده از اسپاچولا و برس به سرعت روی سطح لام پخش شدند و به آزمایشگاه پاتولوژی انتقال یافتند. سپس نمونه ها رنگ آمیزی و براساس متد بتسدا تفسیر شدند. بررسی پاتولوژی نمونه ها توسط یک متخصص پاتولوژی انجام گردید. بخش دیگری از نمونه ها در یک میلی لیتر محیط ترانسپورت (PBS) قرار داده شد و به سرعت به آزمایشگاه ملکولی منتقل گردید. سواپ های مربوط به ترشحات واژینال پس از هموژن سازی در محیط ترانسپورت در دمای ۲۰ـ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جهت انجام آزمایش ملکولی، جداسازی DNA ویروس پاپیلوما از ترشحات واژن بر اساس کیت استخراج DNG (سیناژن) صورت گرفت. DNA استخراج شده از نظر کمی (۱/۹< OD> ۱/۶) و از نظر کیفی با استفاده از جفت پرایمرهای PCO3: 5'- ACACAACTGTGTTCACTAGC -3' و PCO4: (5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3')، که قطعه ای از ژن ß-globlobin انسانی را تکثیر می نماید همزمان با روش PCR مولتی پلکس سنجیده شد. در مرحله بعد DNA های استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان اجرای واکنش PCR نگهداری شدند. جهت تایپینگ ۱۲ تیپ HPV که شامل تیپ های ۱۶،۱۸،۳۱،۳۳،۳۵،۳۹،۴۵،۵۲،۵۶،۵۸،۵۹،۶۶ بود، تمامی نمونه‌ها تحت سه سری PCR بر اساس پرایمر های اختصاصی کیت High Risk HPV Typing شرکت Sacace (ایتالیا) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در PCR سری اول تیپ‌های پر ریسک، سری دوم تیپ‌های دارای ریسک میانه، سری سوم تیپ های کم ریسک مورد ارزیابی قرار گرفتند. پرایمرهای به کار رفته جهت تکثیر ژنوم ویروسی شامل MYO9(5'- CGT CCM AAR GGA WAC TGA TC-3') و- MYO11(3'- GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG -5') بودند. درنهایت آشکار سازی و عکس برداری محصولات PCR زیر نور UV، پس از الکتروفورز محصولات به مدت ۴۵ دقیقه بر روی ژل آگاروز۲ درصد حاوی ۱ – ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید انجام گرفت(شکل۱). نتایج در نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ وارد شد. به این ترتیب نتایج HPV PCR به عنوان استاندارد طلایی تلقی شد و با یافته های سیتولوژی پاپ اسمیر مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین با استفاده از آزمون آماری مک نمار هماهنگی پاپ اسمیر با استاندارد طلایی مورد مقایسه قرار داده شد. P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری محسوب گردید.

یافته ها

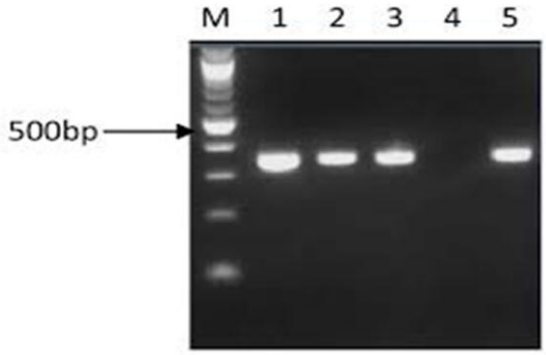
میانگین سنی بیماران ۷/۹ ± ۳۱/۸ سال و در محدوده سنی ۲۰ تا ۵۴ سال قرار داشتند . از ۴۵ نمونه سواپ واژن بیماران دارای زگیل تناسلی ،۳۷ نمونه (۸۲/۲ ٪) مثبت و ۸ مورد (۲۷/۸٪) از نظر وجود HPV DNA منفی گزارش شد. در این بررسی میزان حساسیت و ویژگی روش PCR در تشخیص HPV به ترتیب ۹۹/۲ درصد و ۸۲/۸ درصد گزارش گردید. بر اساس نمونه پاپ اسمیر از ۴۵ نمونه ۱۳ مورد (۲۹ ٪) بدخیمی و ۳۲ مورد (۷۱ ٪) طبیعی مشاهده شد. موارد بدخیمی شامل ۸ مورد(۱۷/۷٪) سلول های سنگفرشی آتیپیک با اهمیت نامشخص(ASCUS) ، ۱ مورد (۲/۲ ٪) سلول های سنگفرشی آتیپیک با شک به ضایعه با درجه بالا(ASCH) ، ۳ مورد(۶/۶ ٪) ضایعه داخل اپیتلیالی با درجه پایین (LSIL) و ۱ مورد(۲/۲ ٪) سلول های آتیپیک گلاندولار (AGC) بود. در این بررسی فقط ۱۳ مورد از ۳۷ فرد مبتلا به پاپیلوما بودند که با روش PCR مثبت گزارش شدند که در این افراد با روش پاپ اسمیر بدخیمی گزارش شده بود. بنابراین روش پاپ اسمیر در ۶۵ درصد موارد نتایج منفی کاذب نشان داده است.

بحث

سرطان دهانه رحم شیوع جهانی دارد و شایع ترین نوع سرطان در کشورهای در حال توسعه به شمار می رود. از نظر فراوانی سرطان گردن رحم دومین سرطان شایع در بین زنان است و سالانه بیش از ۴۰۰/۰۰۰ مورد از این بدخیمی در جهان گزارش می گردد که تقریبا ۱۲درصد سرطان‌های شایع در بین زنان را شامل می شود (۱۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- شکل الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۲درصد می باشد. که Mنمایانگر مارکر ۱۰۰ bp، شماره ۱ نمایانگر کنترل مثبت، شماره ٤ نمایانگر کنترل منفی و شماره های ۲ و ۳ و ٥ نمایانگر بیماری با عفونت پاپیلوما ویروس (با طول باند ۳۸۰) می باشد.

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که برخی از انواع HPV کـه به تیپ‌های پرخطر معروف هستند، نقش مهمـی در ایجـاد سرطان سرویکس دارند به طوری که این تیپ‌هـا در بـیش از ۹۹ درصد سرطان‌های سرویکس در جهان شناسایی شده اند (۱۲).

آزمایش پاپ اسمیر که ضایعات و عوارض حاصل از عفونت را مشخص می کنند، بدلیل سهولت و ارزانی نسبی به عنوان یک آزمایش رایج جهت غربالگری بیماران در سراسر جهان مورد استفاده قرار می گیرد اما متاسفانه موارد منفی کاذب در این آزمایش بسیار بالاست (۱۳-۱۵). تکرار غربالگری در زمان های معین می تواند تا حدی حساسیت پایین یک روش را جبران کند. در غربالگری سرطان سرویکس به روش پاپ اسمیر دو خطای عمده باعث کاهش حساسیت آزمون می شود .اولین خطا در نمونه گیری است که ممکن است از ضایعه نمونه برداری نشود یا اگر نمونه هم برداشته شود به لام منتقل نشود. خطای بعدی در تشخیص است، هنگامی که سلول های بدخیم در نمونه وجود دارد ولی تشخیص داده نمی شوند. بنابراین توقع داشتن حساسیت کامل از یک آزمون یا برنامه غربالگری واقع بینانه نمی باشد (۱۶).در مطالعه ای که در ایران به بررسی علل پایین بودن کیفیت غربالگری سرطان سرویکس در نظام بهداشتی درمانی در یکی از استان های کشور پرداخته شده است، مهمترین موارد به ترتیب شامل اشکال در آماده سازی لام توسط سیتولوژیست ها (۷۴/۵٪) و عدم نمونه گیری صحیح توسط نمونه گیران (۱۱/۷ ٪) بوده است (۱۷). شیوع دیسـپلازی سـرویکس در آمریکا و بر اسـاس پاپ اسـمیر ۲-۱۲ درصد گزارش شده است که این شیوع در مناطق مختلف جهان بسیار متفاوت است(۱۸). در مطالعه black و همکاران شیوع کلی دیسپلازی سرویکس در ۳۴۰۰ زن ۱۸ تا ۶۵ ساله، ۱/۲ درصد گزارش شده است(۱۹). در مطالعه مشابهی در شمال اسکاتلند شیوع دیسپلازی سرویکس در زنان مورد مطالعه ۰/۴ درصد بدست آمده است(۲۰). در مطالعه توتونچیان در کاشان که بر روی ۱۰۰۰ مورد پاپ اسمیر صورت گرفته بود، میزان کلی دیسپلازی سرویکس ۱ درصد (۲۱) و در مطالعه حسینی که بر روی ۱۰۰۰ پاپ اسمیر انجام گرفت میزان دیسپلازی سرویکس حدود۱/۸ درصد گزارش گردیده است (۲۲). اهدایی و همکاران میزان کلی دیسپلازی سرویکس را در ۵۰۰۰ مورد پاپ اسمیر به میزان ۱/۱۲ درصد گزارش کردند(۲۳). در بررسی ما از بین ۴۵ مورد پاپ اسمیر ۱۳ مورد (۲۹٪) دارای دیسپلازی سرویکس بودند که این میزان متفاوت تر از آمارهای ذکر شده می باشد. در این بررسی تمامی موارد پاپ اسمیر از افراد دارای دیسپلازی سرویکس تهیه گردیده بود، در حالیکه در تمام مطالعات دیگر موارد مورد بررسی شامل نمونه های پاپ اسمیر جهت غربالگری بود لذا این تفاوت در شیوع قابل توجیه می باشد. از آنجایی که عفونت های HPV معمولا بدون علامت هستند، لذا جهت تشخیص عفونت نیاز به روش هایی جهت بهبود روند غربالگری می باشد (۲۴). تکنیک PCR به دلیل توانایی در تکثیر DNA ویروس با استفاده از پرایمر های اختصاصی به عنوان یکی از حساس ترین روش ها جهت شناسائی HPV در بافت‌های تناسلی محسوب می گردد که دقت ۹۹ درصد در تـشخیص عـفونت را دارد (۲۵). بـکارگیری آن در کنار

Archive of SID

www.SID.ir

روش های سیتولوژیک می تواند در افزایش قدرت تفکیک و دقت بررسی های کلینیکی بیماران به نحو چشمگیری موثر واقع گردد (۱۴). یافته های آزمایشگاهی در مورد تشخیص ژنوم HPV در نمونه ها حاکی از آنست که میزان شیوع تیپ های سرطان زای HPV در بیماران مورد مطالعه در این بررسی ۸۲/۲ درصد بود که با نتایج مطالعات در برخی مناطق دیگر ایران همسویی دارد. در پژوهشی که در شمال ایران (مازندران) صورت گرفته است میزان حضور HPV در نمونه های سرطان دهانه رحم ۸۱/۴ درصد نشان داده شده است (۱۳).این بررسی نشان می دهد که فراوانی عفونت با HPV در موارد سرطان های دهانه رحم در ایران نیز قابل توجه بوده و با دیگر مناطق جهان قابل مقایسه است (۲۶). Gonzalez و همکاران با بررسی ۱۰۴ نمونه بیوپسی از زنان مبتلا به بدخیمی های سرویکس نشان داده اند که فراوانی عفونت با HPV در بین این ضایعات ۵۶/۴ درصد بود (۲۷). Marino و همکاران در سال ۲۰۰۹، ۲۶۱ نمونه را از نظر وجود HPV مورد بررسی قرار دادند و اعلام نمودند که ۲۳۴ نمونه از ۲۶۱ نمونه (۸۹/۶ ٪) از نظر وجود عفونت با HPV مثبت می باشد (۲۸). در این مطالعه میزان شیوع پاپیلوما ویروس در بین ۴۵ نمونه بر اساس آزمایش ملکولی (HPV PCR) ۸۲/۲ درصد حاصل شد در حالیکه براساس آزمایش شایع غربالگری پاپ اسمیر ۲۹ درصد موارد مبتلا به دیسپلازی سرویکس ناشی از درگیری فرد با پاپیلوما ویروس مشاهده شدند. عدم توافق بین نتایج حاصله از PCR با پاپ اسمیر ناشی از ویژگی و حساسیت پائین روش پاپ اسمیر است.

نتیجه گیری

پیشنهاد شده است که با توجه به شیوع عفونت پاپیلوما ویروس در میان زنان جوان مبتلا به سرطان سرویکس و وجود دوره طولانی مدت پیش سرطانی این عفونت، تمام زنان بالای ۲۰ سال از نظر سیتولوژیک و همچنین بررسی موارد مشکوک از نظر پاپیلوما ویروس انسانی بررسی شوند. انجام موفق این رویکرد زمانی محقق خواهد شد که کیفیت این غربالگری بالاتر از آنچه باشد که اکنون وجود دارد. لذا با توجه به یافته های این طرح غربالگری همزمان به وسیله پاپ اسمیر و HPVPCR توصیه می گردد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین و کارکنان محترم باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن که این پژوهش با حمایت مالی آنان اجرا گردید، کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

1. Keyhani E, Kohan Nia N, Izadi Mod N, Keyhkhaee MR, Najm Abadi H. *The prevalence of human papilloma virus(HPV)in malignant cervical lesion, using multiplex PCR*. Tehran University Medical Journal. 2006; 64(3): 95-101.[Persian]

2. Burd EM. *Human papillomavirus and cervical cancer*. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(1):1-17.

3. Freeman HP, Wingrove BK. *Excess cervical cancer mortality: a marker for low access to health care in poor communities*. National Cancer Institute. 2005; 5: 52-82.

4. Cooper CP, Saraiya M, McLean TA, Hannan J, Liesmann JM, Rose SW, et al. *Report from the CDC. Pap test intervals used by physicians serving low-income women through the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program*. J Womens Health. 2005; 14(8): 670-678.

5. Behbakht K, Lynch A, Teal S, Degeest K, Massad S. *Social and cultural barriers to Papanicolaou test screening in an urban population*. Obstet Gynecol. 2004;104(6): 1355-1361.

6. Hoyo C, Yarnall KS, Skinner CS, Moorman PG, Sellers D, Reid L. *Pain predicts nonadherence to pap smear screening among middle-aged African American women*. Prev Med. 2005; 41(2): 439-445.

7. Jacobs EA, Karavolos K, Rathouz PJ, Ferris TG, Powell LH. *Limited English proficiency and breast and cervical cancer screening in a multiethnic population*. Am J Public Health. 2005; 95(8): 1410-1416.

8. Wright Jr TC, Schiffman M. *Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening*. N Engl J Med. 2003; 348(6): 489-490.

9. Kyndi M, Frederiksen K, Kruger-Kjaer S. *Cervical cancer incidence in Denmark over six decades (1994-2000)*. Acta Obstet Gynecol Scand. 2006; 85: 106-111.

10. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, et al. *Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women:population based prospective follow up study*. BMJ. 2002; 325(7364): 572-576.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. *Prevalence of HPV DNA in cervical cancer : a Worldwide Perspective.* JNCI J Natl Cancer Inst. 2000; 87(11): 796-802.

12. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. *Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection*. CMAJ 2001; 164(7):1017-25.

13. Castañeda-Iñiguez MS, Toledo-Cisneros R, Aguilera-Delgadillo M. *Risk factors for cervico-uterine cancer in women in Zacateceas*. Salud Publica Mex. 2000; 40(4): 330-338.

14. Jabarpor M, Esmaeeli M, Dastranj A. *Determinating the types of human papilloma virus oncogene by Multiplex PCR in lesions of cervical cancer in the North West region of Iran.* Journal of Tropical and Infectious Diseases. 2008; 29: 34-41.[Persian]

15. Hamkar R, Mokhtari_Azad T, et al. *Prevalence of various types of HPV among cervical cancer and normal biopsy in north of Iran. Iranian J.* of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2004; 8: 22-29. [Persian]

16. Hamkar R, Azad TM, Mahmoodi M, Seyedirashti S, Severini A, Nategh R. *Prevalence of human papillomavirus in Mazandaran province, Islamic republic of Iran*. Eastern Mediterranean health journal. 2002; 8(6): 805-11.

17. Allan BR, Marais DJ, Denny L, Hoffman M, Shapiro S, Williamson AL. *The agreement between cervical abnormalities identified by cytology and detection of high-risk types of human papillomavirus*. S Afr Med J. 2006; 96(11): 1186-1190.

18. Safaeian M, Solomon D, Castle PE. *Cervical cancer prevention--cervical screening: science in evolution*. Obstet Gynecol Clin North Am. 2007; 34(4): 739-760.

19. Black M. *Diagnosis and management of cervix dysplasia.* J Lower Gen Tract Dis. 1996; 2: 32-36.

20. Abati A. *Cervix dysplasia and management of cervical cytology.* American Cancer Society .1996; 5: 23-29.

21. Totonchian F. *Review of relationship between marriage age and parity with cervical lesions in three clinics in Kashan*. PhD thesis. School of Medicine. Kashan University of Medical Sciences. 1996. [persian]

22. Hosseini M. *Evaluation of dysplasia and cervicitis in 1000 case of Pap smear*. PhD thesis. School of Medicine. Kashan University of Medical Sciences.1998. [persian]

23. Ehdayi vand F, Niknejad M, Amini N. *Survey 5000 Samples of cervical dysplasia on Pap smear in Ardebil city*. Journal of Ardebil medical science. 2005; 5: 22-25. [Persian]

24. Kornegay JR, Roger M, Davies PO, Shepard AP, Guerrero NA, loveras BL. *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):1080-1086.

25. Soper D. *Reducing the health burden of HPV infection through vaccination.* Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 2006; 20: 1-5.

26. Rintala M, Grénman S, Puranen M, Isolauri E, Ekblad U, Kero P. *Transmission of high – risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland*. j clin microbial. 2005; 43(1): 376-381.

27. González-Losa Mdel R, Rosado-Lopez I, Valdez-González N, Puerto-Solís M. *High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients*. J Clin Virol. 2004; 29(3): 203-206.

28. Marino JF, Fremont-Smith M. *Direct-to-vial experience with auto Cyte REP in a small New England cytology practice*. J Reprod Med. 2001; 46(4): 353-358.

Archive of SID

www.SID.ir