

Molecular isolation of a human papilloma virus from blood serum in patients with leukemia in Kerman

Ranjbar-Zeidabadi H¹, Kheirkhah B^{2*}

1- Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, I. R. Iran.
2- Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, I. R. Iran.

Received: 2018/05/9 | Accepted: 2018/07/17

Abstract:

Background: Cancer is the second common cause of death in developed countries. Viruses are one of the most important environmental factors which increase the risk of developing cancer. The aim of this study was to identify the human papilloma virus (HPV) in patients with the blood cancer.

Materials and Methods: In this case-control study, blood serum samples were collected from 35 patients with Chronic lymphocytic leukemia (CLL) and 25 patients with Acute lymphoblastic leukemia (ALL) from Kerman medical centers. Thirty healthy individuals were considered as a control group. After DNA extraction from the serum samples, the polymerase chain reaction (PCR) was performed to detect HPV.

Results: The specific sequence of HPV was observed in 15 samples (25%) of the patients' serum. Out of this number, five samples (14.25%) of the 35 patients had CLL and 10 samples (40%) of 25 patients had ALL. Also, no positive sample was found in the serum of the patients of the control group. Out of the 15 patients suffering from HPV, seven (46.62%) and three (19.98%) had HPV16 and HPV18, respectively and five samples (33.4%) were of other types of HPV.

Conclusion: This study showed that the PCR method with specific primers of Papilloma Virus 16 and 18 is a suitable and accurate method for detecting human papillomavirus.

Keywords: Cancer, Human papilloma virus, CLL, ALL

* Corresponding Author.

Email: babakkheirkhah@yahoo.com

Tel: 0098 913 345 4787

Fax: 0098 864 224 1511

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2018; Vol. 22, No 4, Pages 355-361

Please cite this article as: Ranjbar-Zeidabadi H¹, Kheirkhah B. Molecular isolation of a human papilloma virus from blood serum in patients with leukemia in Kerman. *Feyz* 2018; 22(4): 355-61.

جداسازی مولکولی ویروس پاپیلومای انسانی از سرم خون بیماران مبتلا به سرطان خون در شهر کرمان

حامد رنجبر زیدآبادی^۱، بابک خیرخواه^{۲*}

خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان دومین عامل شایع مرگ‌ومیر در کشورهای توسعه یافته است. یکی از مهم‌ترین علل محیطی در ایجاد سرطان ویروس-ها می‌باشند. هدف از این مطالعه شناسایی ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) در بیماران مبتلا به سرطان خون است.

مواد و روش‌ها: برای انجام این مطالعه مورد-شاهدی سرم خون از ۳۵ نمونه مبتلا به CLL و ۲۵ نمونه مبتلا به ALL از مراکز درمانی کرمان جمع‌آوری گردید. سی فرد سالم نیز به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. پس از استخراج DNA از نمونه‌های سرمی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت شناسایی HPV انجام گردید.

نتایج: توالی اختصاصی HPV در ۱۵ نمونه (۲۵ درصد) از سرم بیماران مشاهده شد. از این تعداد، ۵ نمونه (۱۴/۲۵ درصد) از بین ۳۵ بیمار مبتلا به CLL و ۱۰ نمونه (۴۰ درصد) از بین ۲۵ بیمار مبتلا به ALL بودند. در سرم هیچ‌یک از افراد گروه کنترل نیز هیچ نمونه مثبتی یافت نشد. از ۱۵ نمونه مبتلا به HPV، ۷ نمونه (۴۶/۶۲ درصد) تیپ HPV16، ۳ نمونه (۱۹/۹۸ درصد) تیپ HPV18 و ۵ نمونه (۳۳/۴ درصد) انواع دیگر HPV بودند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که روش PCR با پرایمرهای اختصاصی پاپیلوما ویروس ۱۶ و ۱۸ روشی مناسب و دقیق برای تشخیص ویروس پاپیلومای انسانی است.

واژگان کلیدی: سرطان، ویروس پاپیلومای انسانی، CLL، ALL

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۴، مهر و آبان ۹۷، صفحات ۳۶۱-۳۵۵

مقدمه

سرطان دومین عامل ایجاد ۱۵-۲۰ درصد سرطان‌ها در سراسر جهان و نیز ۷۰ درصد سرطان‌ها در کشورهای شرق مدیترانه می‌باشند [۵،۴]. یکی از مهم‌ترین علل محیطی در ایجاد سرطان، ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) می‌باشد [۶]. پاپیلوماویروس-ها (PVs) گروه کوچکی از ویروس‌های بدون پوشش با DNA دو رشته‌ای هستند که جزء خانواده پاپیلوماویریده می‌باشند [۶،۷]. HPV به‌عنوان یکی از علل سرطان، از جمله سرطان دهانه رحم، شناخته می‌شود [۷]. تا به امروز، بیش از ۱۰۰ ژنوتیپ مختلف HPVها به‌طور کامل مشخص شده است. مهم‌ترین بیماری مرتبط با HPV بدون شک سرطان است [۸]. HPV در حدود ۷ تا ۴۵ درصد نمونه‌های سرم یا پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان گردن رحم یافت می‌شود [۹]. این میزان اختلاف به‌علت تفاوت در مواد هدف (سرم)، روش‌های استخراج DNA، ابزار مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل DNA یا PCR معمولی، Real Time PCR و یا آنزیم‌های PCR و همچنین پرایمرها می‌باشد [۱۰]. مطالعات متعدد نشان داده است که HPV نقش مهمی در پیشرفت سرطان دهانه رحم دارد [۱۲،۱۱]. باوجود شواهد متعدد که نشان می‌دهد HPVها از طریق جنسی منتقل می‌شوند، اما مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند که انتقال از راه دیگری نیز ممکن است رخ دهد [۱۳]. اعتقاد بر این است که HPVها نمی‌توانند از طریق خون به محل-های مختلف بدن گسترش یابند، زیرا HPVها باعث ایجاد ویرومی

سرطان دومین عامل شایع مرگ‌ومیر در کشورهای توسعه‌یافته و سومین عامل در کشورهای در حال توسعه است [۱]. بر اساس آخرین بررسی‌های اپیدمیولوژیک در ایران، سرطان بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی و حوادث غیرعمدی، سومین عامل مرگ‌ومیر محسوب می‌شود؛ به‌طوری‌که سالانه بیش از ۳۰ هزار نفر از جمعیت ایران در اثر این بیماری جان می‌بازند و تخمین زده شده سالانه بیش از ۷۰ هزار مورد جدید سرطان در کشور رخ دهد [۲،۱]. سرطان خون حدود ۸ درصد کل سرطان‌ها را تشکیل می‌دهد که در کشورهای توسعه‌یافته بیشتر اتفاق می‌افتد [۲]. اگرچه عامل اصلی سرطان خون هنوز ناشناخته است، اما محققان بر این باورند که عوامل ژنتیکی و محیطی در بروز این بیماری نقش دارند [۳]. پیش‌گیری از سرطان، تشخیص زودرس و درمان به‌موقع بر کاهش میزان مرگ‌ومیر ناشی از آن موثر است.

^۱ گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

^۲ استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروب شناسی

تلفن: ۰۹۱۳۳۴۵۴۷۸۷ | ددرنویس: ۰۰۹۸۸۶۴۲۴۱۵۱۱

پست الکترونیک: babakkheirkhah@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۹ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۴/۲۶

استخراج DNA

استخراج DNA ویروسی از سرم به روش فنل کلروفرم انجام گردید. در این روش ابتدا $100 \mu\text{l}$ از هر نمونه پلاسما با $10 \mu\text{l}$ از محلول RNX plus مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس، $200 \mu\text{l}$ کلروفرم به محلول اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در 13000 RPM سانتریفیوژ گردید. پس از انتقال فاز رویی به میکروتیوب جدید، هم‌حجم آن ($150-200 \mu\text{l}$) ایزوپروپانول اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای -20°C درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در 13000 RPM سانتریفیوژ گردید. پس از تخلیه فاز رویی، به رسوب $200 \mu\text{l}$ اتانول ۷۰ درصد افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در 13000 RPM سانتریفیوژ گردید. در پایان، پس از تخلیه و خشک شدن میکروتیوب‌ها مقدار $40 \mu\text{l}$ آب مقطر استریل (DEPC) به DNA اضافه شده و خلوص DNA استخراج شده در طول موج $260/280$ توسط بیوفتومتر (آلمان، اپندرف) در محدوده $1/8$ برآورد گردید.

PCR

پس از استخراج DNA آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن HPV16 و HPV18 (جدول شماره ۱) [۴] و نیز با استفاده از کیت Master mix (شرکت سیناژن) انجام گردید. برای انجام PCR $1 \mu\text{l}$ master mix، $12/5 \mu\text{l}$ DNA، $2 \mu\text{l}$ پرایمر رفت و $1 \mu\text{l}$ پرایمر برگشت (100 pmol) و $8/5 \mu\text{l}$ آب مقطر (حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر) در لوله‌های اپندروف استریل مخلوط گردید. آزمون PCR مطابق با برنامه جدول شماره ۲ انجام شد.

نتایج

میزان آلودگی به HPV در ۱۵ نمونه (۲۵ درصد) از سرم بیماران مشاهده شد. از این تعداد ۵ نمونه (۱۴/۲۵ درصد) از بین ۳۵ بیمار مبتلا به CLL و ۱۰ نمونه (۴۰ درصد) از بین ۲۵ بیمار مبتلا به ALL بودند. اطلاعات دموگرافیک افراد در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. ۴۵ نمونه (۷۵ درصد) از لحاظ آلودگی به HPV منفی بودند. در سرم ۳۰ نمونه از گروه شاهد نیز هیچ نمونه مثبتی یافت نشد. آزمون آماری مجذور کای نشان داد که بین گروه‌های بیماران و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P=0/001$) (جدول شماره ۴). گروه افراد آلوده به HPV و افراد غیرآلوده از نظر جنسیت، سن، مدت زمان ابتلا به بیماری و سابقه تزریق خون با استفاده از آزمون مجذور کای مورد بررسی قرار

نمی‌شوند. با این حال، چندین مطالعه اخیر نشان داده‌اند که HPV را می‌توان در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (سرم خون، پلاسما و خون بند ناف شریانی) یافت [۱۷-۱۴]. بیش از ۱۰۰ تیپ مختلف از HPVها با کمک روش‌های مولکولی شناخته شده است [۱۸]. از میان تیپ‌های مختلف این ویروس، حدود ۴۰-۳۰ درصد آن‌ها سبب آلودگی‌های مخاطی، به‌خصوص در نواحی آنونژیتال می‌باشند [۵]. فقدان توانایی کشت ویروسی باعث می‌شود که شناسایی اولیه ویروس مشکل شود. بنابراین، روش‌های مولکولی از جمله روش‌های بر پایه آمپلیفیکاسیون و PCR بهترین راه جهت شناسایی ویروس‌ها می‌باشند [۱۹]. بسیاری از مطالعات تنها در بیماران مبتلا به سرطان گردن رحم در زنان و با اندازه نمونه‌های نسبتاً کوچک انجام شده است. فقط انواع HPV مخاطی در خون شناسایی شده و هیچ تکرار ویروسی فعال یافت نشده است [۱۳]. با این وجود، تاکنون تحقیقاتی مبنی بر وجود HPV در خون افراد مبتلا به سرطان خون Chronic lymphocytic leukemia (CLL) و Acute lymphoblastic leukemia (ALL) انجام نشده است. باتوجه به این یافته‌ها، هدف این مطالعه جداسازی مولکولی ویروس پاپیلوما‌ی انسانی (HPV) از سرم خون بیماران مبتلا به سرطان خون و مقایسه شیوع آلودگی HPV در گروه مبتلایان به ALL و CLL با افراد سالم در شهر کرمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

برای انجام این مطالعه مورد-شاهدی طی بهار سال ۱۳۹۶ تعداد ۶۰ نمونه خون از بیماران مبتلا به سرطان خون (۳۵ نمونه مبتلا به CLL و ۲۵ نمونه مبتلا به ALL) همراه با ۳۰ فرد سالم به‌عنوان کنترل (انتخاب شده از بین بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های افضل‌ی‌پور، شفا، باهنر و سیدالشهدا شهر کرمان به-دلایل غیرمرتبط با سرطان و بیماری‌های خونی) جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری پس از مشخص نمودن هدف مطالعه برای شرکت-کنندگان و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هریک از آن‌ها صورت پذیرفت (کد اخلاق: IR.KMU.REC.1396.61). هم‌زمان با گرفتن نمونه‌های خون حاوی EDTA از بیماران مبتلا به سرطان خون برای هر بیمار یک فرم پرسشنامه شامل سن، جنس و سابقه تزریق خون تهیه گردید. پلاسمای نمونه‌های مورد مطالعه در دمای -70°C درجه سلسیوس قرار داده شدند. به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات حاصل از نتایج از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۸ و سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

گرفتند. بررسی‌های آماری انجام شده روی عوامل احتمالی خطر- ساز ابتلا به HPV نشان داد که بین جنسیت، سن و مدت زمان ابتلا به بیماری رابطه معنی‌داری وجود ندارد (جدول‌های شماره ۵ و ۶). ۷۳/۲۶ درصد افراد آلوده به HPV سابقه دریافت خون و فرآورده‌های خونی داشتند که بر اساس نتایج آزمون مجذور کای

اختلاف با گروه کنترل در سطح $P \leq 0.05$ معنی‌دار بود. نتایج آزمون PCR نشان داد که ۷ نمونه HPV16 و ۳ نمونه HPV18 وجود دارد. لازم به ذکر است که در هیچ‌کدام از نمونه‌ها هر دو نوع HPV مشاهده نشد (شکل شماره ۱).

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

اندازه محصول ژن	توالی پرایمر	ژن‌ها
۴۵۰bp	F 5' CGTCCACAAGAGGGATACTGATC3'	MY09/MY1
	R 5' GCACCAGGGATCATAACTAATGG3'	
۲۱۷bp	F 5' ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG3'	HPV16
	R 5' CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC3	
۱۰۰bp	F 5' CTTTCGGGTGGCACTACATTGG3'	HPV18
	R 5' AAGCGCCAGCAGTATTTTCATC3'	

جدول شماره ۲- برنامه دمایی و زمانی PCR مورد استفاده در مطالعه حاضر

مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه
دنا تورا سیون اولیه	۹۵°C	۵ دقیقه	۱
دنا تورا سیون ثانویه اتصال پرایمرها	۹۵°C	۴۰ ثانیه	۴۰
	۵۸°C	۱ دقیقه	
	۷۲°C	۲ دقیقه	
گسترش اولیه	۷۲°C	۷ دقیقه	۱

جدول شماره ۳- اطلاعات دموگرافیک گروه‌های مطالعه

گروه	مورد	شاهد	P	میانگین	انحراف معیار
سابقه دریافت خون	بله	۴۱(۱۰۰)	۰	۰/۰۳۵	
	خیر	۱۹(۳۸/۷۸)		۳۰(۶۱/۲۲)	
جنس	زن	۴۰(۷۲/۷۳)		۱۵(۲۷/۲۷)	۰/۰۰۱
	مرد	۲۰(۵۷/۱۵)		۱۵(۴۲/۸۵)	
سن				۳۵	۲۰/۲۲

جدول شماره ۴- توزیع فراوانی آلودگی به HPV بین گروه‌های مطالعه

نتایج تست PCR	مثبت	منفی
گروه‌ها		
CLL	۵(۱۴/۲۷)	۳۰(۸۵/۵)
ALL	۱۰(۴۰)	۱۵(۶۰)
کنترل	۰	۳۰(۱۰۰)
n=۳۰		

جدول شماره ۵- توزیع فراوانی آلودگی به HPV و گروه غیرآلوده به تفکیک جنسیت

گروه	مورد	شاهد
جنس	آلوده به ویروس	فاقد آلودگی به ویروس
	فاقد آلودگی به ویروس	آلوده به ویروس
زن	۱۱ (% ۲۷/۵)	۲۹ (% ۷۲/۵)
مرد	۴ (% ۲۰)	۱۶ (% ۸۰)

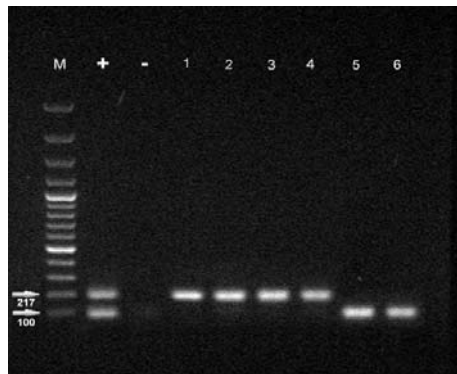
جدول شماره ۶- توزیع فراوانی آلودگی به HPV و گروه غیرآلوده برحسب رده‌های سنی

سن	شاهد		مورد	
	فاقد آلودگی به ویروس	آلوده به ویروس	فاقد آلودگی به ویروس	آلوده به ویروس
۱-۲۰	۱۰(۱۰۰)	۰	۱۳ (۶۵)	۷(۳۵)
۲۰-۶۰	۱۰(۱۰۰)	۰	۱۵(۷۵)	۵(۲۵)
بیشتر از ۶۰ سال	۱۰(۱۰۰)	۰	۱۷ (۸۵)	۳(۱۵)

نشان داد که PBMC ها می‌توانند حامل‌های HPV باشند و این ویروس را از طریق خون انتقال دهند [۱۶]. چندین آزمایش نشان داده‌اند که HPV در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم [۲۰-۲۵] و نیز در پلاسما بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم وجود دارد [۲۶، ۱۴]. مطالعات دیگر نشان می‌دهند که تغییرات توالی اینتراتیپیک HPV ممکن است عامل خطر برای پیشرفت نئوپلاستیک داخل اپی‌تلیالی و انواع مختلف سرطان گردن رحم باشد [۲۷]. Slawa Szostek و همکاران حالت فیزیکی ویروس HPV تیپ ۱۶ در ضایعات داخل اپی‌تلیال دهانه رحم را بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که عوامل متعددی به تداوم HPV و پیشرفت آن در سرطان گردن رحم کمک می‌کند که از آن جمله می‌توان به سرکوب سیستم ایمنی به‌علت عفونت با HPV یا سایر میکروارگانیسم‌ها، شروع زودهنگام زندگی جنسی، روش‌های هورمونی بلند مدت پیشگیری از بارداری، سیگار کشید و عفونت با سایر بیماری‌های مقاربتی اشاره کرد [۲۶]. مشکلات و همکاران پژوهشی در مورد تشخیص HPV تیپ ۱۶ و ۱۸ در نمونه‌های سرطان گردن رحم انجام دادند. در مطالعه آنها بیش از ۲۰۰ تیپ HPV براساس توالی داده‌های DNA ژنومی شناخته شده است که توالی ۸۵ نوع از آنها به‌خوبی مشخص گردیده و ۱۲۰ نمونه تاحدی ژنوتیپ‌های جدید و بالقوه بودند [۲۷]. Ho و همکاران به منظور تشخیص HPV نوع ۱۶، ۱۸ و ۵۲، خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم را با استفاده از Real Time PCR مورد ارزیابی قرار دادند. از بین ۶۰ بیمار مبتلا به سرطان گردن رحم، ۲۷ درصد در نتایج آزمایش HPV در نمونه‌های خون مثبت گزارش شد [۲۸]. بنابراین، برآورد شده است که HPV ۳-۵ درصد از همه سرطان‌های انسانی را ایجاد می‌کند [۳۰، ۲۹]. پیشنهاد می‌گردد یک پژوهش به‌صورت کوهورت در جامعه آماری بزرگ-تر و در استان‌های مختلف ایران در مورد عوامل مرتبط ابتلا به لوسمی حاد انجام گیرد تا بتوان عوامل خطر ساز سرطان و نحوه پیشگیری از سرطان را دقیق‌تر مورد بررسی قرار داد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که روش PCR با پرایمرهای



شکل شماره ۱- ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی HPV. از چپ به راست: M: مارکر، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ مثبت از لحاظ حضور ژن HPV16. نمونه‌های ۵ و ۶ مثبت از لحاظ حضور ژن HPV18

بحث

مطالعه حاضر روی ۶۰ نمونه بیماران مبتلا به سرطان خون (۳۵ نمونه مبتلا به CLL، ۲۵ نمونه مبتلا به ALL) در کرمان انجام شد. نتایج آزمایش PCR در این بررسی نشان‌دهنده حضور HPV16 و HPV18 به ترتیب ۴۶/۶۲ و ۱۹/۹۸ درصد بود. در مطالعه‌ای که در استرالیا صورت گرفت، ۱۸۰ نمونه خون از مردان سالم اهداکننده خون (۷۶-۱۸ ساله) توسط خدمات خون صلیب سرخ استرالیا جمع‌آوری شد. بعد از استخراج DNA ژنومی، نمونه‌ها برای تشخیص حضور HPV با استفاده از روش PCR و جفت پرایمرهای اختصاصی ارزیابی شده و در نمونه‌های مثبت، نوع HPV با استفاده از کلونینگ و توالی‌یابی مشخص گردید. HPV در ۸/۳ درصد اهداکنندگان خون گزارش شد. طیف گسترده‌ای از انواع مختلف HPV از PBMC ها مشاهده گردید که شامل پاپیلوما ویروس گاما و پاپیلوما ویروس آلفای مخاطی بودند. این HPV ها معمولاً در عفونت‌های بدون علامت مشخصی یافت می‌شوند [۱۹]. در یک مطالعه دیگر HPV در تک سلول‌های خون محیطی منجمد شده (PBMCs) از ۵۷ بیمار مبتلا به HIV شناسایی گردید که ۸ بیمار و ۳ اهدا کننده خون برای گروه HPV نوع ۱۶ مثبت گزارش شدند. از میان ۸ بیمار، ۷ نفر به‌واسطه انتقال خون (سه نفر مبتلا به هموفیلی) مبتلا به HPV بودند. این داده‌ها

ارشد میکروبیولوژی می‌باشد که در تاریخ ۱۳۹۶/۶/۳۱ در دانشگاه آزاد اسلامی سیرجان به تصویب رسیده است. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از همکاران و پرسنل محترم بخش میکرو-بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان و همچنین سرکار خانم زهرا معصومعلی نژاد تقدیر و تشکر نمایند.

اختصاصی پاپیلوما ویروس ۱۶ و ۱۸ روشی مناسب و دقیق برای تشخیص ویروس پاپیلوما‌ی انسانی است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل نتایج بخشی از پایان‌نامه کارشناسی

References:

- [1] Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(6): 518-27.
- [2] World Cancer Report 2014. World Health Organization; 2014. p. Chapter 5.13. ISBN 9283204298.
- [3] Hutter JJ. Childhood leukemia. *Pediatr Rev* 2010; 31(6): 234-41.
- [4] Zinatizadeh MR, Masoumalinejad Z, Parnak F. Prevalence of Mycoplasma hyorhinis contamination in tissues samples from cancer patients: A Brief Report. *Mod Med Lab J* 2017; 1(3): 91-5.
- [5] Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infect Dis* 2009; 9(1): 119.
- [6] De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Viol.* 2004; 324(1): 17-27.
- [7] Baliga MS, Dsouza JJ. Amla (*Emblica officinalis Gaertn*), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. *Eur J Cancer Prev* 2011; 20(3): 225-39.
- [8] Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111(6): 581-7.
- [9] Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6(11): 4171-5.
- [10] Liu VW, Tsang P, Yip A, Ng TY, Wong LC, Ngan HY. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 2001; 82(2): 269-72.
- [11] Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sørensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000; 355(9222): 2189-93.
- [12] Ylitalo N, Sørensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Pontén J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16

and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000; 355(9222): 2194-8.

[13] Tseng CJ, Pao CC, Lin JD, Soong YK, Hong JH, Hsueh S. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis. *J Clin Oncol* 1999; 17(5): 1391.

[14] Dong SM, Pai SI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(1): 3-6.

[15] Tsai HJ, Peng YW, Lin LY, Chou MC, Lee H, Chiou HL. An association between human papillomavirus 16/18 deoxyribonucleic acid in peripheral blood with p16 protein expression in neoplastic cervical lesions. *Cancer Detect Prev* 2005; 29(6): 537-43.

[16] Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM. Could human papillomaviruses be spread through blood?. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11): 5428-34.

[17] Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of human papillomavirus. *Viol J* 2008; 5(1): 106.

[18] Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2013; 382(9895): 889-99.

[19] Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6): 2509-14.

[20] Chen AC, McMillan NA, Antonsson A. Human papillomavirus type spectrum in normal skin of individuals with or without a history of frequent sun exposure. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 11): 2891-7.

[21] Kay P, Allan B, Denny L, Hoffman M, Williamson AL. Detection of HPV 16 and HPV 18 DNA in the blood of patients with cervical cancer. *J Med Virol* 2005; 75(3): 435-9.

[22] Kedzia H, Gozdicka-Jozefiak A, Wolna M, Tomczak E. Distribution of human papillomavirus 16 in the blood of women with uterine cervix carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 1992; 13(6): 522-6.

- [23] Pao CC, Hor JJ, Yang FP, Lin CY, Tseng CJ. Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. *J Clin Oncol* 1997; 15(3): 1008-12.
- [24] Pao CC, Lin SS, Lin CY, Maa JS, Lai CH, Hsieh TS. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Pathol* 1991; 95(4): 540-6.
- [25] Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kiviat NB, Kuypers J, Hughes JP, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(11): 796-802.
- [26] Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, Kosz-Vnenchak M. Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. *Acta Biochim Pol* 2009; 56(2): 337.
- [27] Meshkat Z, Soleimanjahi H, Mahmoudi M, Mirshahabi H, Hassan ZM, Ghaffari SR, et al. Determination of human papillomavirus type 16 genotype and construction of cloning vector pTZ57R encoding HPV16 E7 gene. *Saudi Med J* 2007; 28(10): 1511-5.
- [28] Ho CM, Yang SS, Chien TY, Huang SH, Jeng CJ, Chang SF. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 2005; 99(3): 615-21.
- [29] Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis* 1971; 47(1): 1-13.
- [30] Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118(12): 3030-44.