

Development of a Multiplex Taqman Real-time PCR method based on the E6 gene for detection of 31 and 33 HPV genotypes in women with cervical cancer

Samaneh Khandan¹, Rasoul Zahmatkesh Roodsari^{2*}

¹Department of Genetics, To. C Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

²Department of Cell and Molecular Biology, To. C Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 15 Mar 2025

Revised: 22 May 2025

Accepted: 27 May 2025

ePublished: 19 Aug 2025

Keywords:

- Cervical Cancer
- Papillomavirus
- Multiplex Taqman Real-Time PCR
- E6 Gene

Abstract

Background. Infection with human papillomavirus is the most critical risk factor for cervical cancer. Given the lack of detection of this virus type by serological methods, using PCR-based molecular methods is particularly important in the accurate and early detection of this virus. The present study aimed to develop and validate a sensitive and specific method based on TaqMan Real-time PCR for detecting HPV 31 and 33 genotypes using the E6 gene sequence.

Methods. In this descriptive-analytical study, 50 Pap smears of patients with cervical cancer were examined. After genomic DNA extraction, two high-risk genotypes, 31 and 33, were detected using the Multiplex Taqman Real-Time PCR method based on the E6 gene sequence.

Results. This study showed that 28% of the samples were positive for 31 and 33 genotypes. The frequency of infection with the 33 genotype was 22%, and the 31 genotype was 6%. Also, simultaneous infection with both genotypes was observed in 2% of samples. Data analysis showed a sensitivity of 97% and a specificity of 100%.

Conclusion. The Taqman Multiplex Real-Time PCR is an efficient and cost-effective method for screening 31 and 33 HPV genotypes. Due to its high accuracy, this method can be used for the early detection of HPV genotypes.

Practical Implications. Due to its high speed and accuracy, this technique can be suitable and cost-effective for identifying human HPV genotypes.

How to cite this article: Khandan S, Zahmatkesh Roodsari R. Development of a Multiplex Taqman Real-time PCR method based on the E6 gene for detection of 31 and 33 HPV genotypes in women with cervical cancer. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(4):390-400. doi: 10.34172/mj.025.34002. Persian.

Extended Abstract

Background

Cervical cancer is the fourth most common cancer and the second leading cause of cancer death in women worldwide. Persistent infection with high-risk genotypes of human papillomavirus (HPV) in the genital tract is the leading cause. Genotypes 31 and 33 are classified in the high-risk group following genotypes 16 and 18. Two

regulatory genes, E6 and E7, play a crucial role in the initial stages of cervical tumor formation. The precise and timely detection of HPV is essential for effective early screening for cervical cancer. Molecular biology techniques, especially the real-time PCR method, have higher speed, sensitivity, and accuracy in identifying HPV genotypes. Additionally, multiplexing reduces errors when

*Corresponding author; Email: zahmatkesh.rasoul@gmail.com

© 2025 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

simultaneously identifying genotypes. The present study aimed to develop and validate a sensitive and specific TaqMan Real-time PCR-based method for detecting genotypes 31 and 33 using the E6 gene sequence.

Methods

In this descriptive-analytical study, 50 abnormal Pap smear samples from patients with cervical cancer and HPV infection were collected from pathology laboratories in Rasht city. Informed consent forms were obtained from all patients to participate in the study. Specific primers and probes were designed to detect HPV 31 and 33 genotypes in the E6 gene. Each TaqMan probe was labeled with a separate fluorescent dye. Genomic DNA extraction from samples was performed using a tissue DNA extraction kit per its protocol. Before performing the Multiplex Real-Time PCR method, the PCR reaction was conducted in three replicates for each genotype. This was done to optimize the primers and probes' concentration and the appropriate annealing temperature. Three different concentrations of primers and probes were tested for each genotype. To optimize the fluorescence value in the Real-Time PCR method on the E6 gene in the multiplex system, various concentrations of primers (0.1, 0.2, and 0.4 μ M) and probes (0.05, 0.1, and 0.2 μ M) were tested. Once the primers were optimized, multiplex Real-Time PCR was performed on the samples using the designed primers and probes. Single-mode reactions were conducted for each strain using primers and probes corresponding to each genotype to compare the performance of single-mode and multiplex reactions. In the next step, intra- and inter-assay reproducibility was evaluated based on the cycle threshold (Ct) and coefficient of variation (CV). To determine the limit of detection (LOD) of the developed test, the desired amplicon was amplified using specific primers for each strain in a thermocycler. To evaluate and measure the performance of the developed method, HPV positive samples were analyzed using a diagnostic kit. Statistical analyses were performed using SPSS software. In statistical analysis, the chi-square test

was used to determine the significance level of the obtained values. A p-value of less than 0.05 ($P<0.05$) was considered significant.

Results

The age range of the patients was 19 to 57 years, with a mean age of 36.2 ± 9.4 . Among the patients, 29 (58%) were under 40, while 21 (42%) were over 40. Based on the data collected in this study, no significant relationship was observed between age and the prevalence of infection in the patients ($P=0.86$). The optimal concentration for two Multiplex Real-Time PCR (genotypes 31 and 33) was determined by the highest RFU and the lowest Ct value. The results showed that the best average concentration for the probe was 0.1 μ mol, and each of the primers (forward and reverse) was 0.2 μ mol. There was no statistically significant difference between Ct values and primer concentration (independent of probe concentration) ($P<0.05$). Based on the results, the best bonding temperature for the reaction was selected as 620°C. After optimizing the appropriate concentration of primer and probe in the two genotypes and the annealing temperature in the single PCR. The same conditions were applied for Multiplex PCR, and the binding results obtained for the multiplex were consistent with the single-plex mode. To determine the limit of detection (LOD), serial dilutions (1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7) were prepared for each HPV genotype. In the method described above, the limit of detection (LOD) was determined as the lowest concentration at which more than 95% of replicate tests yielded positive results. The results indicated that the lowest concentration consistently yielding positive results for both genotypes was 10 copies/ μ L. The results showed that the coefficient of variation Ct obtained in intra-assay and inter-assay repeatability tests for all dilutions was less than 5 percent. This indicates that the method described above has high repeatability. Based on the calculated kappa value ($\text{kappa}=0.978$), the specificity and sensitivity of the developed clinical method were determined to be 100 percent and 97 percent, respectively. Of the 50 Pap smears with HPV infection, 14 (28%) samples were positive for

genotypes 31 and 33. Genotype 31 had a higher frequency than genotype 33, with 11 (22%) patients having genotype 31 and 3 (6%) of them positive for genotype 33. Simultaneously, infection with both types was observed in 2% of the samples.

Conclusion

The developed multiplex Real-time PCR method is an efficient and cost-effective way to identify high-risk HPV genotypes with high sensitivity and specificity. This method is a suitable, specific, and accessible diagnostic that can simultaneously detect multiple HPV genotypes, especially the clinically important 31 and 33 genotypes. Due to the

limitations of this study, such as the small population size and the limited number of samples studied, further research is needed on larger populations and a greater variety of samples with different HPV genotypes in Iran. Additionally, it is necessary to compare and measure the sensitivity and specificity of various molecular methods for detecting different HPV genotypes to establish a comprehensive screening program.

توسعه یک روش Multiplex Taqman Real-time PCR مبتنی بر ژن E6 جهت شناسایی ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ ویروس HPV در زنان مبتلا سرطان دهانه رحم

سمانه خندان^۱، رسول زحمتکش رودسری^{۲*}

^۱گروه ژنتیک، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

^۲گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۵

اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۳/۱

پذیرش: ۱۴۰۴/۳/۶

انتشار برخط: ۱۴۰۴/۰۵/۲۸

کلیدواژه‌ها:

- سرطان دهانه رحم
- ویروس پاپیلومای انسانی
- Multiplex Taqman
- Real-time PCR
- ژن E6

چکیده

زمینه: عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) مهم‌ترین عامل خطر در ابتلا به سرطان دهانه رحم محسوب می‌شود. از آن‌جا که شناسایی گونه‌های مختلف این ویروس از طریق روش‌های سرولوژیک امکان‌پذیر نیست، بهره‌گیری از روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR برای تشخیص دقیق و زود هنگام آن اهمیت ویژه‌ای دارد. هدف از مطالعه حاضر، توسعه و اعتبارسنجی روشی حساس و اختصاصی مبتنی بر TaqMan Real-time PCR به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ ویروس HPV با استفاده از توالی ژن E6 است.

روش کار: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، ۵۰ نمونه پاپ‌اسمیر بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم بررسی شدند. پس از استخراج DNA ژنومی، شناسایی دو ژنوتیپ پرخطر ۳۱ و ۳۳ با استفاده از روش Multiplex Taqman Real-time PCR و بر پایه توالی ژن E6 انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۲۸ درصد از نمونه‌ها به ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ مثبت بودند. فراوانی ژنوتیپ ۳۳ برابر با ۲۲ درصد و ژنوتیپ ۳۱ معادل ۶ درصد بود. همچنین، عفونت هم‌زمان با هر دو ژنوتیپ در ۲ درصد از نمونه‌ها مشاهده شد. تحلیل داده‌ها حساسیت ۹۷ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد روش را نشان داد.

نتیجه‌گیری: روش Taqman multiplex Real-time PCR روشی کارآمد و مقرون به صرفه برای غربال‌گری ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ ویروس HPV است. با توجه به دقت بالای این روش، می‌توان از آن در تشخیص زود هنگام ژنوتیپ‌های HPV بهره برد.

پیامدهای عملی: با در نظر گرفتن دقت و سرعت بالای این تکنیک، روش مذکور می‌تواند ابزار مناسبی برای شناسایی ژنوتیپ‌های پرخطر HPV انسانی باشد.

مقدمه

از ۲۰۰ ژنوتیپ از ویروس HPV شناسایی شده‌اند که در دو دسته پرخطر (HR) و کم‌خطر (LR) طبقه‌بندی می‌شوند. در میان آنها، ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ پس از ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۸ در گروه پرخطر قرار دارند.^۱ ویروس HPV دارای یک DNA دورشته‌ای است که شامل ۳۹ ژن می‌باشد. در این میان، دو ژن تنظیمی E6 و E7 نقش مهمی در مراحل ابتدایی تومورزایی در دهانه رحم ایفا می‌کنند. این دو ژن انکوپروتئین‌هایی را رمزگذاری می‌کنند که در تنظیم چرخه سلولی دخیل‌اند. پروتئین‌های E6 و E7 با غیرفعال‌سازی ژن‌های سرکوبگر تومور p53 و Rb، از مسیر طبیعی آپوپتوز جلوگیری کرده و منجر به تداوم تقسیم سلولی و در نهایت بدخیمی می‌شوند. همچنین، ژن E6 نقش کلیدی در تکثیر ویروس

سرطان دهانه رحم، چهارمین سرطان شایع و دومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در میان زنان جهان به شمار می‌آید. بیش‌ترین میزان بروز آن در میان زنان جوان مشاهده می‌شود.^۱ مطالعات نشان داده‌اند که حدود ۹۹/۷٪ از موارد سرطان دهانه رحم ناشی از عفونت پایدار با ژنوتیپ‌های پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) است.^{۲،۳} عفونت مزمن با HPV منجر به ایجاد ضایعات در سلول‌های اپی‌تلیال دهانه رحم شده و به مرور زمان می‌تواند به سرطان تبدیل شود. شواهد نشان می‌دهند که این نوع سرطان قابل پیشگیری و درمان است و تشخیص زود هنگام آن می‌تواند میزان مرگ‌ومیر ناشی از آن را کاهش دهد.^{۴،۵} تا کنون بیش

*نویسنده مسئول؛ ایمیل: zahmatkesh.rasoul@gmail.com

گرفت. در این مطالعه، ۵۰ نمونه پاپ اسمیر غیرطبیعی از بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم همراه با عفونت HPV از آزمایشگاه‌های آسیب‌شناسی سطح شهرستان رشت جمع‌آوری گردید. معیارهای ورود به مطالعه شامل تأیید ابتلا به سرطان دهانه رحم بر اساس نتایج پاتولوژی و شناسایی عفونت HPV در نمونه پاپ اسمیر با استفاده از کیت‌های تشخیصی اختصاصی و تأیید آن توسط پزشک متخصص زنان و زایمان بود. از تمامی بیماران فرم رضایت‌نامه آگاهانه شرکت در مطالعه بر اساس اعلامیه هلسینکی (ویرایش ۲۰۱۳) در مورد استفاده از نمونه‌های انسانی و کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی اخذ شد. نمونه‌های پاپ اسمیر جمع‌آوری و برای انجام مطالعات مولکولی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی نگهداری شدند. برای طراحی پرایمر و پروب، ابتدا توالی کامل نوکلئوتیدی مربوط به ژن E6 در ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ ویروس HPV با پایگاه ژنی مرجع NCBI Nucleotide دریافت شد. در مرحله بعد با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مانند MEGA6 آنالیزهای هم‌ردیفی انجام و بهترین ناحیه ژن مربوطه (ناحیه حفاظت‌شده) در دو ژنوتیپ انتخاب شدند. طراحی اولیه پرایمرها و پروب‌ها با استفاده از نرم‌افزار AlleleID نسخه ۷ (PREMIER Biosoft, San Francisco, USA) انجام شد. سپس ویژگی‌های پرایمرها و پروب‌ها، از جمله دمای ذوب (Tm) و درصد محتوای GC، در نرم‌افزار Oligo7 (نسخه ۷٫۶۰، آمریکا) مورد ارزیابی قرار گرفت. پروب‌ها به‌صورت اختصاصی برای شناسایی ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ طراحی شده و هر یک با رنگ فلورسانس متفاوت نشان‌دار شدند؛ به‌طوری‌که پروب ژنوتیپ ۳۱ با FAM و پروب ژنوتیپ ۳۳ با HEX فلورسنت شده‌اند. Quencher انتهایی (۳/ هر دو پروب، BHQ1 در نظر گرفته شد. پس از طراحی، اختصاصی بودن پرایمرها با استفاده از ابزار NCBI BLAST بررسی شد. در ادامه، ویژگی‌های ساختاری پرایمرها، شامل احتمال تشکیل ساختارهای لوپ، جفت‌شدگی بازها، ΔG و سایر پارامترهای ترمودینامیکی در نرم‌افزار Oligo7 تحلیل گردید. پروب‌ها و پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت TAG Copenhagen (سفارش ژن فناوران- ایران) سنتز و پس از دریافت رقیق و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. توالی نوکلئوتیدی و خصوصیات پرایمرها و پروب‌های دو ژنوتیپ HPV مطالعه شده در جدول ۱ مشاهده می‌گردد. استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های پاپ اسمیر با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت (Favorgen، تایوان؛ نمایندگی: یکتا تجهیز آزما، ایران) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام

در بافت انسانی ایفا می‌کند.^۶ تشخیص دقیق و زود هنگام HPV نقش مؤثری در غربالگری اولیه سرطان دهانه رحم دارد. از آنجا که HPV تنها بافت اپیتلیال انسان را آلوده می‌کند، امکان کشت آن در محیط آزمایشگاهی وجود ندارد. بنابراین، تشخیص این ویروس عمدتاً به روش‌های سرولوژیک، بافت‌شناسی و تکنیک‌های زیست‌مولکولی وابسته است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که روش‌های سرولوژیک و پاپ اسمیر محدودیت‌هایی در افتراق ژنوتیپ‌های مختلف ویروس دارند و از حساسیت پایینی نسبت به روش‌های مولکولی برخوردارند. لذا، برای تشخیص دقیق‌تر HPV باید از روش‌های زیست‌مولکولی استفاده کرد.^{۹،۸} در روش‌های مولکولی، مولکول‌های DNA، RNA و یا پروتئین‌های ویروسی به‌عنوان شاخص‌های تشخیصی به کار می‌روند. روش‌هایی نظیر ایمونوهیستوشیمی، میکروسکوپ الکترونی، وسترن بلات و ... که بر پایه پروتئین‌های ویروسی عمل می‌کنند، علاوه بر پیچیدگی، زمان‌بر نیز هستند. در مقابل، روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA علاوه بر مقرون به صرفه بودن، از دقت و قابلیت اطمینان بالاتری برخوردارند. در این میان، Real-Time PCR به‌عنوان روشی دقیق، سریع و حساس برای شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف HPV شناخته شده است. همچنین، استفاده از نسخه Multiplex آن امکان تشخیص هم‌زمان چند ژنوتیپ را فراهم می‌سازد، که موجب کاهش خطای تشخیص و افزایش دقت و کارایی غربالگری می‌شود.^{۹-۱۲} تشخیص هم‌زمان ژنوتیپ‌های HPV از اهمیت بالایی برخوردار است، چرا که عفونت هم‌زمان با چند ژنوتیپ می‌تواند با نوپلازی درجه ۲ و ۳ در بافت اپیتلیال دهانه رحم مرتبط باشد. مطالعات نشان داده‌اند که سطح mRNA انکوژن‌های E6 و E7 با شدت نوپلازی در دهانه رحم ارتباط مستقیم دارد. ژنوم HPV دارای ناحیه‌ای ۴۵۰۰ جفت بازی است که شش ژن E را رمزگذاری می‌کند. در میان آنها، ژن E6 با رمزگذاری یک انکوپروتئین، از طریق تخریب پروتئین سرکوبگر تومور، چرخه سلولی را طولانی‌تر کرده و با مهار آپوپتوز و افزایش تکثیر سلولی، سلول‌ها را به سمت بدخیمی سوق می‌دهد.^{۱۳،۱۴} باتوجه به اهمیت شناسایی دقیق ژنوتیپ‌های HPV محدودیت روش‌های سنتی، هدف از مطالعه حاضر، توسعه و اعتبارسنجی روشی حساس، اختصاصی و قابل اعتماد بر پایه TaqMan Real-Time PCR به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ با استفاده از توالی ژن E6 می‌باشد.

روش کار

این پژوهش به‌صورت توصیفی-تحلیلی بر اساس اصول راهنمای غربالگری سرطان دهانه رحم (۲۰۱۹ ASCCP)^{۱۵} انجام

شامل: ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۱۲/۵ میکرولیتر RealQ Plus 2X master mixe (دانمارک)، ۰/۲ میکرومول پروب اختصاصی، ۰/۴ میکرومول از هرکدام از پرایمرها (TAG، دانمارک) برای ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ و ۳ میکرولیتر آب مقطر DNase Free تهیه شدند. برنامه استفاده شده برای تکثیر ژن E6 برای ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ شامل: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵°C (۱۰ دقیقه)، ۴۰ تکرار با برنامه ۹۵°C (۲۰ ثانیه)، ۶۲°C (۴۰ ثانیه)، ۷۲°C (۴۰ ثانیه) در دستگاه ریل تایم PCR انجام شد. تکرارپذیری درون آزمون و بین آزمون براساس آستانه چرخه (Ct) و ضریب تغییرات (CV) محاسبه شد. برای تعیین حد تشخیص (Limit of Detection, LOD)، آمپلیکون هدف با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad، آمریکا) تکثیر و سپس با استفاده از الکتروفورز آگارز خالص‌سازی شد. غلظت محصولات برای هر ژنوتیپ با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Eppendorf، آلمان) اندازه‌گیری شد و تعداد کپی‌ها با استفاده از داده‌های حاصل محاسبه شد. از هر قطعه تکثیرشده، رقت‌های متوالی ۱:۱۰ تهیه شد و واکنش Real-Time PCR انجام گرفت. به‌عنوان کمترین غلظت با نرخ شناسایی $\leq 95\%$ درصد برای نمونه‌های مثبت در نظر گرفته شد. برای ارزیابی و سنجش عملکرد روش توسعه یافته تعداد ۵۰ نمونه HPV مثبت و ۳۰ نمونه HPV منفی (بر اساس کیت تشخیصی OpeGen High + Low PapillomaStrip PCR، اسپانیا) مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌های مثبت شامل ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ و نمونه‌های منفی بدون این ژنوتیپ‌ها بودند. حساسیت و ویژگی آزمون بر اساس تطابق نتایج بین روش توسعه‌یافته و کیت تشخیصی محاسبه شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. برای تحلیل تفاوت بین گروه‌ها از آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون‌های مقایسه‌ای چندگانه استفاده شد. همچنین، برای بررسی ارتباط بین متغیرهای طبقه‌ای از آزمون کای دو استفاده شد. سطح معنی‌داری آماری در این مطالعه برابر با مقدار P کمتر از ۵ درصد در نظر گرفته شد. به‌منظور ارزیابی میزان توافق بین نتایج حاصل از ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ در روش مولتی‌پلکس توسعه یافته، مقادیر کاپا ($kappa$) محاسبه گردید.

شد. DNA استخراج شده به لحاظ کیفی با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد رنگ‌آمیزی شده با رنگ Safe Stain (یکتا تجهیز آزما، ایران) و به لحاظ کمی با استفاده از دستگاه بایوفوتومتر (Eppendorf، آلمان) مورد ارزیابی قرار گرفت. قبل از انجام روش Multiplex Real-Time PCR، برای بهینه‌سازی غلظت و دمای اتصال مناسب پرایمرها و پروب‌ها، واکنش Real-Time PCR در سه تکرار جداگانه برای سه غلظت متفاوت پرایمرها و پروب‌ها برای هر کدام از ژنوتیپ‌ها انجام شد. مخلوط اول شامل: ۰/۱ میکرومول از هرکدام از پرایمرها و ۰/۰۵ میکرومول پروب، مخلوط دوم شامل: ۰/۲ میکرومول از هرکدام از پرایمرها و ۰/۱ میکرومول پروب و مخلوط سوم شامل: ۰/۴ میکرومول از هرکدام از پرایمرها و ۰/۲ میکرومول از پروب بود. واکنش Real-Time PCR با استفاده از 2X master mixe (دانمارک) و دستگاه ترموسایکلر Rotor-Gene Q (Qiagen، آمریکا) انجام گرفت. برنامه چرخه حرارتی برای PCR شامل: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵°C (۸ دقیقه)، ۳۵ سیکل با برنامه ۹۵°C (۳۰ ثانیه)، ۶۲°C (۳۰ ثانیه) برای ژنوتیپ ۳۱ و ۶۳°C (۳۰ ثانیه) برای ژنوتیپ ۳۳، ۷۲°C (۴۵ ثانیه) در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. همچنین، برای بررسی اختصاصیت پرایمرها، واکنش PCR برای ناحیه حفاظت شده ژن E6 برای سویه ۳۱ قطعه‌ای به طول ۱۲۶ جفت باز و برای سویه ۳۳ قطعه‌ای به طول ۲۶۰ جفت باز از توالی ناحیه مربوطه از ژنوتیپ‌های ویروس تکثیر گردید. پس از بهینه‌سازی پرایمرها، واکنش Real-Time PCR به‌صورت مالتی‌پلکس بر روی نمونه‌ها با پرایمرها و پروب‌های طراحی شده انجام گرفت. پرایمر و پروب بهینه شده (از نظر غلظت) برای ژنوتیپ‌های هدف در یک مخلوط واکنش با یکدیگر ترکیب شدند. برای مقایسه عملکرد حالت تکی و مولتی‌پلکس، واکنش‌های یک حالتی برای هر سویه با استفاده از پرایمرها و پروب مربوط به هر ژنوتیپ انجام شد. همچنین، آزمون به‌صورت مالتی‌پلکس نیز انجام پذیرفت (استفاده همزمان از پرایمرها و پروب‌ها در یک مخلوط واکنش). پس از انجام مراحل ذکر شده واکنش مالتی‌پلکس در حجم ۲۵ میکرولیتر

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی و خصوصیات پرایمرها و پروب دو ژنوتیپ ۳۱ و ۳۳

ژنوتیپ	توالی	Tm °C	فلوروفور	کد بانک ژنتیک
HPV 31	F: 5'-TGT GTC CAG AAG AAA AAC AAA GAC-3' R: 5'-ACA CTT GGG TTT CAG TAC GAG-3' Probe: FAM-CAT AGG AGG AAG GTG GAC AGG A-BHQ1	۶۲/۴ ۶۳/۶	FAM	J04353
HPV 33	F: 5'-CAT GAT TTG TGC CAA GCA TTG-3' R: 5'-CTC TCT ATA TAC AAC TGT TAA ATC TGC-3' Probe: HEX- AAC ATT GAA CTA CAG TGC GTG GA -BHQ1	۶۱/۷ ۶۳/۲	HEX	M12732

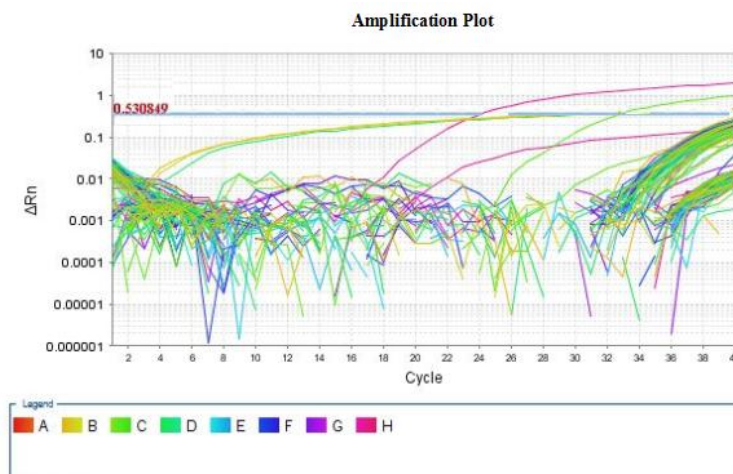
یافته‌ها

در این مطالعه، ۵۰ نمونه پاپ اسمیر غیرطبیعی بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم همراه با عفونت HPV (تأیید شده توسط آزمایشگاه مرجع) مورد بررسی قرار گرفت. محدوده سنی بیماران ۱۹ تا ۵۷ سال با میانگین سنی $36/2 \pm 9/4$ سال بود. از میان بیماران ۲۹ نفر (۵۸٪) زیر ۴۰ سال و ۲۱ نفر (۴۲٪) بالای ۴۰ سال سن داشتند. بر اساس تحلیل‌های آماری، ارتباط معناداری بین سن و شیوع عفونت در بیماران مشاهده نگردید ($P=0/86$). جهت بهینه‌سازی شرایط واکنش Real-Time PCR بر روی ژن E6 در قالب سیستم مولتی‌پلکس، غلظت‌های مختلفی از پرایمر (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میکرومولار) و پروب (۰/۵، ۰/۱ و ۰/۲ میکرومولار) مورد بررسی قرار گرفت. غلظت بهینه برای دو-Multiplex Real-Time PCR (ژنوتایپ‌های ۳۱ و ۳۳)، RFU به‌عنوان بالاترین و Ct به‌عنوان کمترین مقدار واحد فلورسانس نسبی تعیین شد جدول ۲. نتایج نشان داد که بهترین میانگین برای پروب غلظت ۰/۱ میکرومولار و هرکدام از پرایمرها (فوروارد و ریورس) ۰/۲ میکرومولار بود ($P<0/05$). نتایج آنالیز آماری نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری بین مقادیر Ct و غلظت پرایمر (مستقل از غلظت پروب) وجود نداشت ($P>0/05$). همچنین کمترین غلظت پرایمرها به‌عنوان شرایط بهینه بدست آمد. در بررسی گرادیان دمایی اتصال، دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان بهترین دمای واکنش برای کمترین مقدار Ct مشاهده شد جدول ۲. در دو واکنش Multiplex Real-Time PCR انجام شده برای دو ژنوتیپ، اختلاف آماری معنی‌داری بین مقادیر Ct به دست آمده و دماهای اتصال آزمایش شده وجود نداشت ($P>0/05$). بر اساس نتایج آزمایش، بهترین دمای اتصال برای انجام واکنش، دمای ۶۲°C به عنوان دمای مناسب انتخاب شد. پس از بهینه‌سازی شرایط (غلظت پرایمر و پروب و دمای اتصال) در حالت تک‌واکنشی (singleplex)، همان شرایط برای واکنش مالتی‌پلکس نیز اعمال شد. نتایج حاصل از Multiplex Real-Time PCR با واکنش‌های تک‌واکنشی سازگار بود و عملکرد مطلوبی در شناسایی ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ HPV نشان داد. پرایمرها و پروب‌های طراحی شده برای دو ژنوتیپ مورد مطالعه از نظر اختصاصیت و ویژگی در NCBI BLAST مورد تجزیه و تحلیل (در حضور ژنوم انسان و ویروس‌ها با باکتری‌های احتمالی) قرار گرفتند. علاوه بر این، ویژگی in vitro آنها نیز با استفاده از نمونه‌های کنترل، از جمله دو سویه کم خطر HPV (سویه‌های ۱۱ و ۴۲) و باکتری‌های اشرشیا کولی، کلسیالا، لاکتوباسیلوس و استافیلوکوکوس مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون با هیچکدام از نمونه‌های کنترلی واکنش نشان نداد. جهت تأیید نتایج، در دو واکنش پلیمرازی مجزا جفت پرایمر مربوط به ژنوتیپ ۳۱ برای

ژنوتیپ ۳۳ و بالعکس هیچ باندی مشاهده نگردید. برای تعیین حد تشخیص (LOD)، رقت‌های سریالی (۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰۰) برای هر کدام از ژنوتیپ‌های HPV تهیه گردید. میزان LOD برای سویه ۳۱ (به ترتیب رقت ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰، ۹۵، ۹۵، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰) (به ترتیب ۳۳) و برای سویه ۳۳ (به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰، ۹۵، ۹۵، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰) به‌عنوان کمترین غلظت تعیین شد و در آن بیش از ۹۵ درصد از آزمایش‌های تکراری نتایج مثبتی به همراه داشت. نتایج نشان داد که کمترین غلظتی که به‌طور مداوم نتایج مثبتی برای هر دو ژنوتیپ داشت نسخه ۱۰ کپی/میکرولیتر بود شکل ۱. بنابراین حد تشخیص برای روش توسعه‌یافته ۱۰ کپی/میکرولیتر برای دو ژنوتیپ ۳۱ و ۳۳ تعیین شد. در این مطالعه تمامی آزمایشات حداقل سه بار تکرار گردید. نتایج مطالعه نشان داد که واکنش در رقت‌های ۱۰-۱۰۰ میلی‌لیتر خطی بوده و حساسیت واکنش در این روش ۱۰ کپی در هر واکنش بود. آزمون‌های تکرارپذیری درون‌سنجی و بین‌سنجی در رقت‌های سریالی نام برده انجام گردید و نتایج در جدول ۳ مشاهده می‌گردد. همانطور که نشان داده شده است ضریب تغییرات Ct به دست آمده در آزمون‌های تکرارپذیری درون‌سنجی و بین‌سنجی برای تمام رقت‌ها کمتر از ۵ درصد بود که خود نشان دهنده این موضوع است که روش فوق دارای تکرارپذیری بالایی می‌باشد جدول ۳. در ارزیابی توسعه روش Multiplex Real-Time PCR، این روش با دقت بالا توانست دو ژنوتیپ ۳۱ و ۳۳ را شناسایی نماید. بر اساس مقدار کاپای محاسبه شده (کاپا برابر ۰/۹۷۸) روش فوق در مقایسه با کیت تطابق بالایی را نشان داد. اختصاصیت و حساسیت روش بالینی توسعه‌یافته به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۷ درصد محاسبه شد. اگرچه نمونه‌های مورد مطالعه به سایر ژنوتیپ‌های پرخطر و کم‌خطر HPV (بر اساس تشخیص با کیت تشخیصی) آلوده بود، اما ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ به‌درستی با روش فوق شناسایی گردید. از ۵۰ پاپ اسمیر دارای عفونت HPV، ۱۴ نمونه (۲۸٪) برای ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ مثبت بودند. ژنوتیپ ۳۱ فراوانی بیشتری را نسبت به ژنوتیپ ۳۳ نشان داد؛ بدین صورت که ۱۱ نفر (۲۲٪) از بیماران مبتلا به ژنوتیپ ۳۱ و ۳ نفر (۶٪) آنها برای ژنوتیپ ۳۳ مثبت بودند. همچنین، عفونت همزمان با دو تیپ نیز در ۲ درصد از نمونه‌ها مشاهده گردید. با این وجود، در هر دو ژنوتیپ با استفاده از روش فوق، سیگنال‌های مثبت بر اساس پرایمر و پروب‌های اختصاصی مشاهده گردید که خود نشان‌دهنده حساسیت و دقت بالای تکنیک برای ردیابی HPV در نمونه‌های انسانی می‌باشد.

جدول ۲. بهینه‌سازی دما و غلظت پرایمرها و پروب‌ها برای واکنش Real-Time PCR و میانگین Ct

ژنوتیپ	غلظت پرایمر	غلظت پروب	میانگین Ct	RFU	تغییرات دمایی (C°)	میانگین Ct
HPV 31	۰/۱	۰/۰۵	۲۶/۷۵	۸۲۶	۶۳ ^۰ C	۲۴/۲۳
	۰/۲	۰/۱	۲۵/۵۹	۱۷۶۰	۶۰ ^۰ C	۲۴/۷۶
	۰/۴	۰/۲	۲۶/۲۸	۲۴۳۵	۵۸ ^۰ C	۲۵/۱۷
HPV 33	۰/۱	۰/۰۵	۲۹/۴۳	۵۶۷	۶۳ ^۰ C	۲۶/۴۷
	۰/۲	۰/۱	۲۸/۶۱	۹۴۶	۶۰ ^۰ C	۲۶/۸۳
	۰/۴	۰/۲	۳۰/۲۶	۱۳۴۰	۵۸ ^۰ C	۲۷/۱۱



شکل ۱. منحنی آستانه در رقت‌های مختلف برای تعیین حساسیت پرایمرهای مربوط به ژنوتیپ‌های HPV. تعداد سیکل‌های آستانه روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی مربوط به ΔRn بر روی محور عمودی نشان داده شده است.

جدول ۳. تکرار پذیری درون سنجی و بین سنجی آزمون

تکرارپذیری بین سنجی			تکرارپذیری درون سنجی			ژنوتایپ
CV (%)	Mean Ct $\pm$ SD	رقت (copy/ μ L)	CV (%)	Mean Ct $\pm$ SD	رقت (copy/ μ L)	
۱/۷۱	۳۵/۱۶ $\pm$ ۰/۲۴	۱	۱/۸۳	۳۴/۲۱ $\pm$ ۰/۲۷	۱	HPV31
۱/۲۴	۳۲/۷۱ $\pm$ ۰/۱۷	۱۰۱	۱/۰۶	۳۱/۷۴ $\pm$ ۰/۱۹	۱۰۱	
۱/۳۲	۳۰/۸۳ $\pm$ ۰/۵۳	۱۰۲	۰/۳۵	۲۹/۵۷ $\pm$ ۰/۶۸	۱۰۲	
۰/۷۶	۲۶/۴۶ $\pm$ ۰/۵۷	۱۰۳	۰/۶۵	۲۵/۴۵ $\pm$ ۰/۳۱	۱۰۳	
۱/۴۱	۲۳/۳۷ $\pm$ ۱/۳۱	۱۰۴	۱/۶۸	۲۲/۴۱ $\pm$ ۰/۴۵	۱۰۴	
۰/۹۳	۲۰/۲۷ $\pm$ ۰/۰۷	۱۰۵	۱/۲۶	۱۸/۱۲ $\pm$ ۰/۱۷	۱۰۵	
۱/۰۳	۱۶/۱۷ $\pm$ ۰/۲۶	۱۰۶	۰/۲۳	۱۴/۸۶ $\pm$ ۰/۲۹	۱۰۶	
۱/۸۳	۱۳/۵۷ $\pm$ ۰/۳۹	۱۰۷	۱/۹۴	۱۲/۶۳ $\pm$ ۰/۵۳	۱۰۷	
۰/۸۲	۳۳/۶۴ $\pm$ ۰/۲۸	۱	۰/۸۹	۳۳/۹۰ $\pm$ ۰/۳۴	۱	HPV33
۱/۳۴	۳۰/۰۶ $\pm$ ۰/۴۰	۱۰۱	۱/۴۱	۳۱/۵۶ $\pm$ ۰/۴۳	۱۰۱	
۰/۵۷	۲۸/۹۲ $\pm$ ۰/۱۲	۱۰۲	۱/۵۶	۲۹/۰۴ $\pm$ ۰/۵۳	۱۰۲	
۰/۳۱	۲۵/۵۲ $\pm$ ۰/۵۱	۱۰۳	۰/۶۸	۲۶/۳۴ $\pm$ ۰/۵۷	۱۰۳	
۱/۱۴	۲۲/۸۷ $\pm$ ۰/۰۶	۱۰۴	۰/۷۴	۲۳/۱۷ $\pm$ ۰/۱۶	۱۰۴	
۱/۲۶	۱۸/۱۴ $\pm$ ۰/۳۸	۱۰۵	۱/۹۳	۱۹/۴۳ $\pm$ ۰/۴۲	۱۰۵	
۲/۰۰	۱۵/۷۱ $\pm$ ۰/۲۱	۱۰۶	۲/۲۳	۱۶/۳۲ $\pm$ ۰/۲۳	۱۰۶	
۲/۵۶	۱۱/۴۸ $\pm$ ۰/۰۹	۱۰۷	۲/۴۱	۱۲/۷۵ $\pm$ ۰/۲۷	۱۰۷	

بحث

تشخیص دقیق ژنوتیپ‌های HPV باعث افزایش حساسیت غربالگری برای بدخیمی‌های دهانه رحم می‌شود. محدودیت‌های موجود در تست‌های هیستولوژی در تشخیص زود هنگام سرطان دهانه رحم، باعث طراحی روش‌هایی با دقت و حساسیت بالا بر پایه PCR برای غربالگری HPV گردید.^{۱۵} توانایی تشخیص سریع و اختصاصی ژنوتیپ‌های پرخطر HPV دارای اهمیت زیادی است، چرا که در تصمیم به درمان ضایعه قبل از شدیدتر شدن بیماری کمک زیادی می‌کند. علاوه بر این، انواع کم‌خطر HPV نیز بر روی کیفیت زندگی افراد تأثیر منفی گذاشته که نشان‌دهنده اهمیت ردیابی و شناسایی انواع HPV است.^{۱۶} سنجش‌هایی که قادر به تمایز دادن انواع HPV باشد، درک ما را نسبت به اپیدمیولوژی و آسیب‌شناسی HPV تسهیل می‌نماید.^{۱۷} روش Real-Time PCR با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی TaqMan که با فلوروفورهای متفاوت برچسب‌گذاری شده‌اند، روشی سریع، دقیق و جذاب برای شناسایی همزمان چندین ویروس در یک ویال است.^{۱۸} مولتی‌پلکس کردن این واکنش امکان ایجاد خطاهای ذاتی در انجام چندین واکنش خاص برای یک نمونه مجزا را کاهش می‌دهد.^{۱۹،۱۸} با این حال، روش Multiplex Taqman Real-Time PCR دارای مزایای زیادی از جمله مقرون به صرفه بودن، سرعت بالا، حساسیت بسیار زیاد، کاهش احتمال آلودگی محصولات، بررسی هم‌زمان حجم بالای نمونه‌ها و تکرارپذیری واکنش می‌باشد.^{۲۰} مطالعه حاضر با هدف توسعه و اعتبارسنجی یک روش Multiplex Taqman Real-Time PCR بر پایه ژن E6 برای تشخیص سریع ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ طراحی و اجرا شد. نتایج نشان داد که این روش دارای کاپای ۹۷۸٪ بوده و توانست با دقت بالا دو ژنوتیپ مذکور را شناسایی نماید. همچنین، مقایسه نتایج با کیت تجاری مورد استفاده، تطابق بالایی را نشان داد. حساسیت و ویژگی این روش برای ژنوتیپ‌های ۳۱ و ۳۳ به ترتیب ۹۷ درصد و ۱۰۰ درصد به دست آمد. در مطالعه‌ای توسط محمدی و همکاران، روشی مشابه با استفاده از مولتی‌پلکس برای شناسایی سوبه‌های پرخطر HPV با تمرکز بر ژن‌های E6 و E7 توسعه یافت. هدف آنها شناسایی هم‌زمان ۱۵ ژنوتیپ HPV، به‌ویژه سوبه‌های ۱۶ و ۱۸ بود. آنها گزارش دادند که این روش دارای حساسیت ۹۸ درصدی و اختصاصیت ۱۰۰ درصدی برای این دو ژنوتیپ ۱۶ و ۱۸ است. همچنین، مطابق با مطالعه آنها، با این روش می‌توان به‌طور هم‌زمان چند ژنوتیپ را شناسایی کرد. آنها این روش را مناسب و مقرون به صرفه توصیف کردند.^{۲۱} در مطالعه‌ای دیگر، بوادا و همکاران با بررسی ۲۹۸ بیمار مبتلا به

سرطان دهانه رحم، از روش مولتی‌پلکس برای بررسی ژنوتیپ‌های پرخطر HPV بر پایه ژن‌های L1 و E6/E7 استفاده کردند. آنها گزارش دادند که روش فوق دارای حساسیت ۸۸ درصدی برای غربالگری کلی و ۹۶ درصدی برای شناسایی ژنوتیپ ۱۶ بود و نشان دادند که استفاده هم‌زمان از ژن‌های مختلف می‌تواند دقت تشخیص را افزایش دهد. تجزیه تحلیل مطالعه آنها نشان داد که هم ژن L1 و هم ژن‌های E6/E7 دارای سنجش یکسانی برای تشخیص سوبه‌های پرخطر HPV در سرطان دهانه رحم می‌باشد.^{۲۲} اردلان و همکاران نیز از روش Real-Time PCR برای ردیابی HPV در ۷۲ نمونه مثبت استفاده کردند و توانستند ۴ ژنوتیپ ۱۶، ۱۸، ۱۱ و ۶ را با این روش ردیابی نمایند. نان با وجود موفقیت در شناسایی، به برخی محدودیت‌های این روش نیز اشاره کردند.^{۲۳} مارهاش و همکاران در عراق، با مطالعه بر روی ۳۰۰ زن مبتلا به سرطان دهانه رحم، روش Multiplex Real-Time PCR را برای تشخیص ژنوتیپ‌های پرخطر HPV به کار گرفتند. آن‌ها این روش را مقرون به صرفه، دقیق و سریع معرفی کرده و ژنوتیپ‌های ۱۶، ۱۸ و ۳۱ را شایع‌ترین ژنوتیپ‌های مشاهده‌شده در جمعیت مورد مطالعه گزارش کردند.^{۲۴} در مطالعه‌ای دیگر، دسنویز و همکاران به توسعه و اعتبارسنجی روشی برای تشخیص و کمی‌سازی نسبی بیان انکوژن‌های E6 و E7 در ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۸ HPV پرداختند. آنان پیشنهاد دادند که این روش می‌تواند به‌عنوان تکمیل‌کننده تست‌های سنتی برای پیگیری بیماران در معرض ضایعات پیش‌سرطانی مورد استفاده قرار گیرد.^{۲۵} تفاوت در نتایج گزارش شده در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل اختلاف در مناطق جغرافیایی، مرحله بیماری، توزیع ژنوتایپ‌ها، سبک زندگی، شرایط اقتصادی-اجتماعی و عوامل اپیدمیولوژیک محلی باشد. اگرچه ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۸ در بسیاری از جمعیت‌های جهانی^{۲۶} و ایران^{۲۷} بیشترین شیوع را دارند، اما انجام مطالعات اختصاصی بر روی ژنوتیپ‌های پرخطر دیگر نظیر ۳۱ و ۳۳ نیز ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

روش Multiplex Real-Time PCR توسعه یافته یک روش کارآمد و مقرون به صرفه برای شناسایی ژنوتیپ‌های پرخطر HPV با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالا می‌باشد. این روش به‌عنوان یک روش مناسب تشخیصی اختصاصی و قابل دسترس است که می‌توان توسط آن به‌طور هم‌زمان چندین ژنوتیپ HPV، به خصوص دو ژنوتیپ مهم بالینی ۳۱ و ۳۳ را ردیابی کرد. همچنین، روش فوق می‌تواند یک روش جامع با دقت و کارایی بالا جهت

سمانه خندان: جمع‌آوری نمونه‌ها، انجام آزمایش و تهیه پیش‌نویس اولیه مقاله را بر عهده داشته‌اند. تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را مطالعه و تأیید نموده‌اند.

منابع مالی

این مطالعه حامی مالی نداشت.

دسترس‌پذیری داده‌ها

داده‌های ایجاد شده در این مطالعه در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارائه می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه پس از تأیید کمیته اخلاق در پزشکی پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن با شناسه زیر انجام شد.
IR.IAU.TON.REC.1403.64

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافع در پژوهش حاضر وجود ندارد.

غربالگری ژنوتیپ‌های پرخطر و حتی کم‌خطر HPV باشد که قادر به تشخیص زودهنگام بیماری‌های مرتبط با HPV است. با توجه به محدودیت‌های این مطالعه مانند کوچک بودن جمعیت و تعداد کم نمونه‌های بررسی شده، مطالعات بیشتر بر روی جمعیت‌های بزرگتر و تعداد بالاتر نمونه‌ها با ژنوتیپ‌های متفاوت HPV در ایران می‌باشد. از محدودیت‌های دیگر این مطالعه می‌توان به ردیابی اختصاصی دو ژنوتیپ ۳۱ و ۳۳ و عدم بررسی سایر ژنوتیپ‌ها به‌طور جداگانه اشاره کرد. همچنین، مقایسه و سنجش میزان حساسیت و دقت بین روش‌های مولکولی متفاوت برای شناسایی HPV مورد نیاز است تا یک برنامه غربالگری جامع انجام گیرد.

قدردانی

از حوزه پژوهش و تحصیلات تکمیلی و همچنین پرسنل آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن و از تمام پزشکان و پرسنل مراکز آزمایشگاهی و در نهایت از کلیه بیماران شرکت‌کننده در این پژوهش صمیمانه قدردانی می‌شود.

مشارکت پدیدآوران

رسول زحمتکش رودسری: ایده‌پردازی، طراحی آزمایش، طراحی پرایمرها و پروب‌ها، تحلیل داده‌ها و ویرایش و نگارش نهایی مقاله و

References

1. Zhang S, Xu H, Zhang L, Qiao Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. Chinese Journal of Cancer Research. 2020;32(6):720. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.05.
2. Delam H, Izanloo S, Bazrafshan MR, Eidi A. Risk factors for cervical cancer: An epidemiological review. Journal of Health Sciences & Surveillance System. 2020;8(3):105-9. doi:10.30476/jhsss.2020.86539.1092.
3. Espinoza H, Ha KT, Pham TT, Espinoza JL. Genetic predisposition to persistent human papillomavirus-infection and virus-induced cancers. Microorganisms. 2021;9(10):2092. doi:10.3390/microorganisms9102092.
4. Rogua H, Ferrera L, El Mansouri N, Kassidi F, Aksim M, Aghrouh M, Nejmeddine M, Chouham S. Human Papillomavirus genotypes distribution and associated risk factors among women living in Southern Morocco. Heliyon. 2023;9(11):e22497. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e22497.
5. Farias C, Peñaloza MJ, Acuña D, Flores C, Bernal G. Prevalence of Human Papilloma Virus in Coquimbo, Chile. Cancer Epidemiology. 2025;95:102757. doi:10.1016/j.canep.2025.102757.
6. Zhang Y, Qiu K, Ren J, Zhao Y, Cheng P. Roles of human papillomavirus in cancers: oncogenic mechanisms and clinical use. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2025;10(1):44. doi:10.1038/s41392-024-02083-w.
7. Molina MA, Steenbergen RD, Pompe A, Kenyon AN, Melchers WJ. HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait. Trends in Molecular Medicine. 2024;30(9):890-902. doi:10.1016/j.molmed.2024.05.009.
8. Eun TJ, Perkins RB. Screening for cervical cancer. The Medical clinics of North America. 2020;104(6):1063. doi:10.1016/j.mcna.2020.08.006.
9. Jin J, Li S, Huang H, Li J, Lyu Y, Ran Y, et al. Development of human papillomavirus and its detection methods. Experimental and Therapeutic Medicine. 2024;28(4):382. doi:10.3892/etm.2024.12671.
10. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, Chelmow D, Einstein MH, Garcia F, et al. 2019 ASCCP risk-based management consensus guidelines: updates through 2023. Journal of lower genital tract disease. 2024;28(1):3-6.

11. Bartosik M, Moranova L, Izadi N, Strmiskova J, Sebuyoya R, Holcakova J, et al. Advanced technologies towards improved HPV diagnostics. *Journal of medical virology*. 2024;96(2):e29409. doi: 10.1002/jmv.29409.
12. Mattox AK, D'Souza G, Khan Z, Allen H, Henson S, Seiwert TY, et al. Comparison of next generation sequencing, droplet digital PCR, and quantitative real-time PCR for the earlier detection and quantification of HPV in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2022;128:105805. doi: 10.1016/j.oraloncology.2022.105805.
13. Xu F, Ran T, Wei Q, Pan R, Chen S, Luo J. Diagnostic value of HPV E6/E7 mRNA in screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse: A systematic review and meta-analysis. *Oncology Letters*. 2024;27(5):231. doi: 10.3892/ol.2024.14364.
14. Hareża DA, Wilczyński JR, Paradowska E. Human papillomaviruses as infectious agents in gynecological cancers. *Oncogenic properties of viral proteins*. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(3):1818. doi: 10.3390/ijms23031818.
15. Ramesan CK, Calvin JD, Thomas A, Fletcher J, Kannangai R, Abraham P, et al. Diagnostic study of human papillomavirus DNA detection in cervical and vaginal samples using the filter paper card. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2023;163(2):660-6. doi: 10.1002/ijgo.14906.
16. Xi X, Cao WL, Yao X, Chen J, Huang D, Yang T, et al. Rapid diagnosis of seven high-risk human papillomavirus subtypes by a novel loop-mediated isothermal amplification method. *Molecular and Cellular Probes*. 2022;61:101787. doi: 10.1016/j.mcp.2021.101787.
17. Nelson CW, Mirabello L. Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity. *Tumour virus research*. 2023;15:200258. doi: 10.1016/j.tvr.2023.200258.
18. Nagy A, Vitásková E, Černíková L, Křivda V, Jiřincová H, Sedlák K, et al. Evaluation of TaqMan qPCR system integrating two identically labelled hydrolysis probes in single assay. *Scientific reports*. 2017;7(1):41392. doi: 10.1038/srep41392.
19. Zhang Y, Xu S, Wen Z, Gao J, Li S, Weissman SM, Pan X. Sample-multiplexing approaches for single-cell sequencing. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(8):466. doi: 10.1007/s00018-022-04482-0.
20. Zhao L, Zhao X, Fan T, Tian E, Wang C, Zhang Y, et al. Multiplex TaqMan real-time PCR assay for high-throughput identification of highly toxic mushroom species-induced foodborne poisoning. *Lwt*. 2023;186:115211. doi: 10.1016/j.lwt.2023.115211.
21. Mohammadi A, Lotfi E, Karamali F, Golab F, Barati M. Development and validation of a multiplex qPCR method for identification of high-risk genotypes of human papillomavirus. *Infectious Agents and Cancer*. 2025;20(1):15. doi: 10.1186/s13027-024-00633-z.
22. Boada EA, Cuschieri K, Graham C, Moncur S, Bhatia R. Agreement between L1 and E6/E7-based assays for detection of high-risk HPV in cervical, oropharyngeal and penile cancers. *Journal of Clinical Pathology*. 2023;76(7):467-73. doi: 10.1136/jclinpath-2021-208054.
23. Ardalan A, Esfahani V. Detection and Genotyping of HPV Infection Using a New Method Based on Real-Time PCR. *PMJ*. 2021;6(20):15-7. doi: 10.22034/pmj.2021.243879.
24. D Marhash A, S Abdul-Razaq M, AL-Jeborri MM, Jasim W, Khaleel Khalaf S. The Application of Multiplex Real-Time PCR to Detect High-Risk HPV in Iraqi Population. *Journal of Obstetrics, Gynecology and Cancer Research*. 2025;10(6):444-51. doi: 10.30699/jogcr.10.6.444
25. Bordigoni A, Motte A, Tissot-Dupont H, Colson P, Desnues C. Development and validation of a multiplex qPCR assay for detection and relative quantification of HPV16 and HPV18 E6 and E7 oncogenes. *Scientific Reports*. 2021;11(1):4039. doi: 10.1038/s41598-021-83489-2.
26. Kusters JM, Brouwer JG, van Benthem BH, Heijne JC, Schim van der Loeff MF. Global type-specific genital human papillomavirus prevalence in men, by sexual orientation: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2023;228(8):1023-32. doi: 10.1093/infdis/jiad109.
27. Akbarzadeh-Jahromi M, Taheri N, Dashtdar B, Taheri N, Abiri F, Zare M. The Prevalence of Human Papilloma Virus Infection and Its High Risk Genotypes among Healthy Women in 28 Provinces in Iran; A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Biostatistics and Epidemiology*. 2023;9(2):173-88. doi: 10.18502/jbe.v9i2.14625