تحقیقی

مولکولار اپیدمیولوژی پاپیلوماویروس انسانی و انواع پرخطر آن(HPV-16, 18) در بافت سرطانی پستان به روش PCR در استان گلستان

عبدالوهاب مرادی
دانشیار ،دانشگاه علوم پزشکی گلستان،دانشکده پزشکی ،گروه میکروبیولوژی

الهام مبشری
استادیار، زنان دانشگاه علوم پزشکی گلستان

علیجان تبرائی
استادیار ، دانشگاه علوم پزشکی گلستان-دانشکده پزشکی ،گروه میکروبیولوژی-مرکز تحقیقات عفونی

سپیده بخشنده نصرت
استادیار،گروه زنان -مرکز تحقیقات عفونی ، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

وحیده کاظمی نژاد
استاد یار-گروه پاتولوژی -مرکز تحقیقات عفونی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

رامین آذرهوش
استاد یار-گروه پاتولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

شهریار علیزاده
متخصص، پاتولوژی

مسعود بازوری
کارشناس، میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

نویسنده مسئول: عبدالوهاب مرادی
تلفن: ۰۹۱۱۱۷۷۲۱۰۷
پست الکترونیک: abmoradi@ yahoo.com
آدرس: گرگان ، بلوار هیرکان، ابتدای جاده شصت کلا ،مجموعه فلسفس دانشکده پزشکی

وصول مقاله: ۸۸/۶/۱
اصلاح نهایی: ۸۸/۷/۲
پذیرش مقاله: ۸۸/۷/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: *سرطان پستان یکی از شایعترین سرطانها در زنان است. عوامل اتیولوژیک متعددی همچون زمینه ژنتیکی، تغذیه ای و برخی از عوامل محیطی از جمله ویروسها را از عوامل خطرزا در این سرطان شناخته اند. براساس مطالعات صورت گرفته گمان می رود پاپیلوماویروسها یکی از عوامل احتمالی سرطان پستان باشد. این مطالعه وجود ژنوم پاپیلوما ویروس در بافتهای سرطانی پستان را در استان گلستان مورد بررسی قرار داده است.*

روش بررسی: *این مطالعه توصیفی تحلیلی از سال ۱۳۸۴ تا سال ۱۳۸۷صورت گرفت و جامعه مورد مطالعه خانمهایی بودند که به بیمارستانهای شهرهای گرگان و گنبدکاوس مراجعه کرده اند و از پستان آنها بیوپسی گرفته یا ماستکتومی شده بودند و پاتولوژیست در آنان سرطان پستان تشخیص داده بود. از نمونه ها DNA استخراج و سپس با پرایمرهای عمومی GP5+/GP6+ و MY09/MY11 از نظر ژنوم پاپیلوماویروس مورد بررسی قرار گرفتند.*

یافته ها: *در کل ۲۳۱ نفر مورد مطالعه قرار گرفت میانگین سنی افراد ۱۲/۷۲± ۴۷ بود. جوانترین فرد ۲۰ ساله و مسن ترین آنها ۸۴ ساله بود. تعداد ۱۲۲ نمونه از گرگان و ۱۰۹ نمونه از گنبد جمع آوری شدند. ۳۱/۴٪ افراد مورد مطالعه مبتلا به Infiltrating ductular carcinoma ، ۶۰/۱٪ مبتلا به Infiltrating duct carcinoma، ۴/۳٪ مبتلا به Intraductal and lobular carcinoma و بقیه به انواع دیگر سرطان پستان مبتلا بودند. در گروه سنی ۴۰ تا ۵۰ سال با ۳۳/۸٪ افراد مبتلا بیشترین گروه سنی مورد مطالعه بودند. در هیچ یک از نمونه ها موارد آلودگی به پاپیلوماویروس یافت نشد.*

نتیجه گیری: *با توجه به انتشار نتایج متفاوت از نقاط مختلف دنیا مبنی بر حضور و عدم حضور پاپیلوماویروس در نمونه های سرطانی پستان، نتایج این مطالعه آثاری از ژنوم پاپیلوماویروس را اثبات نکرده است. بنابراین برای پی بردن به نقش این ویروس در ایجاد سرطان پستان در منطقه نیاز به مطالعات بیشتری است.*

واژه‌های کلیدی: *سرطان پستان، پاپیلوماویروس، استان گلستان*

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایعترین سرطانها در زنان است. براساس گزارش سال ۲۰۰۴ سازمان جهانی بهداشت از کل مرگهایی که به علت سرطان در سال ۲۰۰۲ در بین زنان اتفاق افتاده حدود ۱۵ درصد آن به علت سرطان پستان بوده است. عوامل اتیولوژیک متعددی را برای این نوع سرطان از جمله زمینه ژنتیکی و برخی از عوامل محیطی و حتی تغذیه ای ، خطرزا شناخته اند. از عوامل محیطی،عفونی با پاپیلوماویروسهای انسانی یکی از عوامل خطر زای اصلی در سرطان سرویکس خانمها به شمار می رود.(۱) مطالعات متعددی از قسمتهای مختلف دنیا از جمله آلمان (۲)، نروژ (۳)، آمریکا (۴)، برزیل (۵)، اتریش (۶) و چین (۸،۷) حاکی از وجود ژنوم این ویروس در بافتهای سرطانی پستان است.

از طرفی در مطالعه ای که در امریکا بر روی ۴۳ نمونه سرطان به روش PCR و ساترن بلات صورت گرفت آثاری از ژنوم پاپیلوماویروس پیدا نکردند (۹).

جستجوی ژنوم پاپیلوما ویروس به دو روش PCR و ISH(In Situ Hybridization) بر روی نمونه های سرطان پستان در ایتالیا صورت گرفت و به روش PCR در ۲۹/۴٪ آنها آثار ژنوم پاپیلوماویروس مشاهده شد ولی به روش ISH هیچ کدام از موارد مثبت تائید نگردید (۱۰). در مطالعه ای که در لندن بر روی ۸۰ نمونه سرطان صورت گرفت و هدف تعیین میزان آلودگی به پاپیلوماویروس انسانی بود در هیچ کدام از نمونه ها آثاری از ژنوم ویروس پاپیلوما یافت نگردید (۱۱). مطالعه ای در مکزیک بر روی ۶۷ نمونه سرطان پستان به روش PCR جستجوی ژنوم پاپیلوماویروس را انجام داده است که فقط در سه مورد آن آثاری از ژنوم پاپیلوماویروس یافت شده است (۱۲).

در این مطالعه هدف بررسی ژنوم پاپیلوما ویروس در بافتهای سرطانی پستان در استان گلستان می باشد که در صورت وجود ژنوم پاپیلوماویروس در این نوع سرطان، می توان آن را یکی از عوامل خطرزای احتمالی سرطان پستان نام برد که به دلیل محیطی بودن قابل کنترل بوده و اخیرا نیز برای نمونه های بسیار خطرزای سرطان آن واکسن تهیه شده است. در این مطالعه علاوه بر مشخص نمودن درگیری این ویروس در این نوع سرطان نمونه های پرخطر ویروس درگیر هم مشخص خواهد شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی تحلیلی جامعه مورد مطالعه افرادی اند که به بیمارستانها در شهرهای گرگان و گنبدکاوس مراجعه کرده اند و از پستان آنها بیوپسی گرفته شده یا ماستکتومی شده اند و بافتهای بیوپسی برای بررسی به آزمایشگاههای پاتولوژی (شش آزمایشگاه در گرگان و چهار آزمایشگاه در گنبدکاوس) ارجاع شده و پاتولوژیست بافت برداشته شده از پستان راسرطان تشخیص داده بود. با در نظر گرفتن میزان شیوع پاپیلوماویروس در شش کشور دنیا در بافت سرطانی پستان در این مطالعه ، ۲۳۱ نمونه جمع آوری شد و سپس نمونه ها به آزمایشگاه دانشکده پزشکی منتقل و DNA آنها به روش فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل استخراج گردید.

DNA استخراج شده ابتدا با پرایمرهای بتا گلوبین (PCO3/PCO4) و سپس با پرایمرهای عمومی (GP5+/GP6+) به روش استاندارد PCR شد. همه آنها بدون در نظر گرفتن نتایج PCR با پرایمرهای فوق، با پرایمرهای اختصاصی تیپ ۱۶ و ۱۸ نیز به روش استاندارد مورد بررسی با PCR قرار گرفتند (۱۳). سپس با پرایمرهای عمومی (MY09/MY11) به روش استاندارد PCR شد (۱۴). تمام نمونه ها به روش Touchdown با پرایمرهای GP5+/GP6+ با پروتکل زیر PCR شدند (۱۵).

پروتکل PCRTochdown با پرایمرهای +GP5+/GP6 جهت شناسائی نمونه های آلوده به پاپیلوما ویروس

Protocol	Denaturation	Touchdown annealing cycles	Additional annealing cycles	Extension	Final extension
TDP	1 min, 94°C	2 min, 55°C to 40°C in 1.0°C decrements (16 cycles)	2 min, 40°C (24–34 cycles)	1.5 min, 72°C	4 min, 72°C

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه:

PCO3 5’ ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3’
PCO4 5’ CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3’ (110bp)

GP5+ 5’ TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC 3’
GP6+ 5’ GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C 3’ (149bp)

MY09 5’ CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3’
MY11 5’ GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3’ (450bp)
((M=A+C, W=A+T, R=A+G Y=C+T))

HPV-16/F 5’ TCA AAA GCC ACT GTG TCC TG 3’
HPV-16/R 5’ CGT GTT CTT GAT GAT CTG CA 3’ (119bp)

HPV-18/F 5’ GAC ACA TTG GAA AAA CTA AC 3’
HPV-18/R 5’ TAG TGC CCA GCT ATG TTG TG 3’ (139)

یافته ها

در کل ۲۳۱ نفر مورد مطالعه میانگین سنی افراد ۱۲/۷۲± ۴۷ بود و جوانترین فرد ۲۰ ساله و مسن ترین آنها ۸۴ ساله بود تعداد ۱۲۲ نمونه از گرگان و ۱۰۹ نمونه از گنبد جمع آوری شدند. (جدول یک).

در جدول یک مشخص می باشد که بیشترین موارد ابتلا به سرطان پستان با ۳۳/۸٪ به گروه سنی ۴۰ تا ۵۰ سال تعلق دارد.

در مورد ۱۸۷ نمونه که نوع سرطان پستان نیز مشخص بود ۳۱/۴٪ افراد مورد مطالعه مبتلا به Infiltrating ductular carcinoma ، ۶۰/۱٪ مبتلا به Infiltrating duct carcinoma، ۴/۳٪ مبتلا به Intraductal and lobular carcinoma و بقیه به انواع دیگر سرطان پستان مبتلا بودند جدول شماره ۲).

بعداز استخراج DNA از بافت پارافینه سرطانی این افراد،مقدار DNA را با دستگاه بیوفتومتر اندازه گیری کردیم و مشخص شدکه از تمام بافتها DNA استخراج شده است. سپس دوباره برای سنجش قابلیت DNA برای انجام PCR توسط پرایمر ژن بتا گلوبین به طول ۱۱۰ جفت باز انجام شد که در تمامی نمونه ها مثبت بود. DNAاستخراج شده با پرایمرهای عمومی (GP5+/GP6+ و MY09/MY11) به روش استاندارد PCR شد. همه آنها بدون در نظر گرفتن نتایج PCR با پرایمرهای فوق، با پرایمرهای اختصاصی تیپ ۱۶ و ۱۸ نیز به روش استاندارد مورد بررسی با PCR قرار گرفتند تمام نمونه ها به روش Touchdown با پرایمرهای +GP5+/GP6 ، PCR شدند.

در تمامی روشهای به کار برده شده برای جستجوی ژنوم پاپیلوماویروس انسانی که در بالا ذکر شد در هیچ یک از نمونه ها موارد آلودگی به پاپیلوماویروس یافت نشد.

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی افراد مبتلا به سرطان پستان در منطقه گرگان و گنبد برحسب گروههای سنی

متغییرهای مورد بررسی		محل جمع آوری نمونه		جمع
		گرگان	گنبد	
گروههای سنی به سال	۳۰-۲۰ سال	۳ (٪۲/۵)	۱۵ (٪۱۳/۸)	۱۸ (٪۷/۸)
	۴۰-۳۱ سال	۳۲ (٪۲۶/۲)	۲۷ (٪۲۴/۸)	۵۹ (٪۲۵/۵)
	۵۰-۴۱ سال	۴۷ (٪۳۸/۵)	۳۱ (٪۲۸/۴)	۷۸ (٪۳۳/۸)
	۶۰-۵۱ سال	۱۹ (٪۱۵/۶)	۲۰ (٪۱۸/۳)	۳۹ (٪۱۶/۹)
	بالای ۶۰ سال	۲۱ (٪۱۷/۲)	۱۶ (٪۱۴/۷)	۳۷ (٪۱۶)
جمع		۱۲۲ (٪۵۲/۸)	۱۰۹ (٪۴۷/۲)	۲۳۱ (٪۱۰۰)

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی افراد مبتلا به سرطان پستان برحسب نوع سرطان درگروههای سنی مورد مطالعه

متغیرهای مورد بررسی		گروههای سنی به سال					جمع
		۳۰-۲۰ سال	۴۰-۳۱ سال	۵۰-۴۱ سال	۶۰-۵۱ سال	بالای ۶۰ سال	
نوع سرطان پستان	Infiltrating ductular carcinoma	۰ (٪۰)	۱۹ (٪۴۱/۳)	۲۲ (٪۳۳/۳)	۸ (٪۲۲/۹)	۹ (٪۳۰)	۵۸ (٪۳۱)
	Infiltrating duct carcinoma	۸ (٪۸۰)	۲۴ (٪۵۲/۲)	۳۶ (٪۵۴/۵)	۲۴ (٪۶۸/۶)	۲۱ (٪۷۰)	۱۱۳ (٪۶۰/۴)
	Intraductal and lobular carcinoma	۱ (٪۱۰)	۱ (٪۲/۲)	۴ (٪۶/۱)	۲ (٪۵/۷)	۰ (٪۰)	۸ (٪۴/۳)
	Other	۱ (٪۱۰)	۲ (٪۴/۳)	۴ (٪۶/۱)	۱ (٪۲/۹)	۰ (٪۰)	۸(٪۴/۳)
جمع		۱۰ (٪۵/۳)	۴۶ (٪۲۴/۶)	۶۶ (٪۳۵/۳)	۳۵ (٪۱۸/۷)	۳۰ (٪۱۶)	۱۸۷ (٪۱۰۰)

بحث

در کشورهای توسعه یافته یکی از علل اصلی مرگ و میر خانمها سرطان پستان است که در ۵۰ تا ۸۰٪ موارد علل اصلی آن ناشناخته است (۱۶) در استان گلستان نیز این سرطان در بین پنج سرطان شایع در زنان در سال ۱۳۸۴ با ASR ۲۵/۰۵ در صدهزار نفر جایگاه اول را دارد (۱۷). مطالعات نشان داده است پاپیلوماویروس تیپ ۱۶ و ۱۸ ازعوامل اصلی ایجاد سرطان سرویکس هستند و در سرطان ارگانهای دیگر بدن هم شناسایی شده اند (۱۸). مطالعات مختلفی در ارتباط با سرطان و این ویروس صورت گرفته است که برخی مطالعات وجود و برخی دیگر عدم وجود این ویروس را در بافت سرطانی پستان گزارش نموده اند (۱۱و۱۰). مطالعه حاضر نیز با هدف جستجوی آثاری از ژنوم ویروس در بافت سرطانی افراد مبتلا به سرطان پستان در استان گلستان صورت گرفت.

در مجموع ۲۳۱ نمونه از بافت سرطانی پستان از سراسر استان جمع آوری گردید و به روشهای استاندارد به روش PCR در هیچ کدام از نمونه ها آثاری از ژنوم پاپیلوماویروس یافت نگردید. مطالعات دیگر از کشورهای فرانسه (۱۹) ، هند (۱۸)، سویس (۲۰)، آمریکا (۹)، انگلستان (۱۱) نتیجه مشابه مطالعه ما را دارند و نتیجه گیری می نمایند که پاپیلوماویروس در ایجاد سرطان پستان نقشی ندارند. در مطالعه اوسترو و همکارانش نیز ژنوم ویروس در سرطان پستان یافت نشده است (۲۱). در مطالعه لئوناردو و همکارانش جستجوی ژنوم پاپیلوماویروس با پرایمرهای اختصاصی مثبت و با روش هیبریدیزاسیون محل ژنوم ویروس در سلولهای سرطانی پستان

مشخص نگردیده است(۱۰). در مطالعه ای که توسط ژاپنی ها بر روی نمونه های سرطان پستان صورت گرفته در ۲۱/۴٪ موارد ژنوم ویروس پاپیلوما در بافتهای سرطانی پستان یافت شده است (۲۲). در ایتالیا از ۷۰ نفر که سرطان پستان داشتند نمونه های لاواژ داکتال از قبیل موکوس، شیر و کلستروم گرفته شده و جستجوی HPV صورت گرفته است که در هیچ مورد HPV یافت نشده است (۲۳). در مطالعه ای که در کره جنوبی بر روی ۱۲۳ نمونه کارسینومای پستان و ۳۱ مورد انترواداکتال پاپیلوما جستجوی HPV صورت گرفته در ۶/۵٪ موارد سرطانی ژنوم HPV یافت شده ولی در نمونه های پاپیلوم پستان آلودگی به HPV یافت نشده است (۲۴).

در ۸۱ نمونه سرطان پستان ارسالی از سوئیس در هیچ نمونه ای ژنوم HPV یافت نشده است (۲۰)ولی در همان آزمایشگاه در یک مطالعه دیگر ۸۶٪ موارد آلودگی به HPV در نمونه های سرطان پستان گزارش شده است (۲). مطالعه ای نیز از مکزیک در ۶۷ نمونه سرطان فقط در سه نمونه ژنوم HPV را گزارش نموده است (۱۲). در مطالعه ای که بر روی ۵۰ نمونه بافت سرطانی پستان از نظر HPV صورت گرفته در هیچ موردی ژنوم HPV یافت نشده است (۱۹). در مطالعه دیگری نیز بر روی ۲۱ نمونه فیبروآدنومای پستان صورت گرفته هیچ موردی از ژنوم HPV یافت نشده است (۵). اغلب مطالعاتی که HPV را در بافت سرطانی پستان به میزان کم گزارش نمودند و آنهایی که آثاری از ژنوم ویروس در بافت سرطانی نیافته اند نتیجه گیری می نمایند که پاپیلوماویروسها در ارتباط با سرطان پستان نقشی ندارند. وجود ژنوم پاپیلوماویروس در افراد آلوده به این ویروس در خون و پلاسما (۲۵،۶-۲۷) در در بسیاری از مقالات گزارش شده است. برخی از محققان نتیجه گیری می نمایند ژنوم یافت شده در بافت سرطانی مربوط به پاپیلوماویروس موجود در خون و پلاسما می باشد و مربوط به بافت سرطانی پستان نیست و این یافته ها نیز از نقش پاپیلوماویروسها درسرطان پستان حمایت نمی کند.

همانطور که قبلا نیز ذکر شد در مجموع حدود ۲۳۰ نمونه از بافت سرطانی پستان از سراسر استان جمع آوری گردید و با روشهای استاندارد استخراج DNA و به روش استاندارد PCR در هیچ کدام از نمونه ها آثاری از ژنوم پاپیلوماویروس یافت نگردید و می توان نتیجه گیری نمود که در استان گلستان نیز پاپیلوماویروسها در ایجاد سرطان پستان نقشی ندارند و برای اثبات آن احتیاج به مطالعات گسترده تر می باشد.

References

1-Munoz, N. Bosch, F.X. *Cervical and human papilomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention*. Salud Publica Mex. 1997; 39(4):274-282

2-de Villers EM, Sandstorm RE, zur Hausen H, Buck CE. *Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast*. Breast Cancer Res. 2005;7(1) :1-11

3- Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kyinnsland S, Nesland JM. *Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III)*. Breast Cancer Res Treat. 1999;53(2):121-35

4- Liu Y, Klimberg VS, Andrews NR, Hicks CR, Peng H, Chiriva-Internati M, etal. *Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers*. J Hum Virol. 2001;4(6):329-34.

5- Damin AP, Karam R, Zetller CG, Caleffi M, Alexandre CO. *Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas*. Breast Cancer Res Treat. 2004 ;84(2):131-7.

6- Widschwendter A, Brunhuber T, Wiedemair A, Mueller-Holzner E, Marth C. *Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history*. J Clin Virol. 2004 ;31(4):292-7.

7- Li T, Lu ZM, Guo M, Wu QJ, Chen KN, Xing HP, M, etal. *p53 codon 72 polymorphism (C/G) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in China*. Cancer. 2002;95(12):2571-6

8- Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, etal. *Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese*. Breast Cancer. 2000 ;7(1):33-6.

9- Bratthauer GL, Tavassoli FA, O'Leary TJ. *Etiology of breast carcinoma: no apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18*. Pathol Res Pract. 1992 ;188(3):384-6.

10-Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. *Human papillomavirus in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat. 1992;21(2):95-100.

11-Wrede D, Luqmani YA, Coombes RC, Vousden KH. *Absence of HPV 16 and 18 DNA in breast cancer*. Br J Cancer. 1992 ;65(6):891-4.

12-Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramírez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Morán-Moguel MC, Montoya-Fuentes H. *Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue*.Breast Cancer Research and Treatment.2008;114(1); 189-194

13-Farjadian S, Asadi E, Doroudchi M, Dehaghani A.S, Tabei S.Z, Kumar V.P, Ghaderi A. *High risk HPV types in southern Iranian patients with cervical cancer.* Pathol Oncol Res. 2003;9(2):121-5

14- Dunne E. F, Unger E.R, Sternberg M, McQuillan G, Swan D.C, Patel S.S, Markowitz L.E. *Prevalence of HPV infection among females in the Uniteed States*. JAMA. 2007;297:813-9

15-Evans M.F, Adamson C.S, Simmons-Arnold L, Cooper K. *Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus.* BMC Clin Pathol. 2005 ;16;5:10.

16- de León D.C, Montiel D.P, Nemcova J, Mykyskova I, Turcios E, Villavicencio V, et al. *Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients.* BMC Cancer. 2009. 22;9:26

17-Semnani S, Roshandel G.R, Keshtekar A.A, Moradi A, Noraei S.M, Kalavi KH, et al. *Annual Report of Golestan population-based cancer registry*.payke rayan. 2005;2:2

18- Gopalkrishna V, Singh U.R, Sodhani P, Sharma J.K, Hedau ST, Mandal AK, etal. *Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction*. Breast Cancer Res Treat. 1996;39(2):197-202.

19-de Cremoux P, Thioux M, Lebigot I, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Sastre-Garau X. *No evidence of Human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat. 2008;109(1):55-58

20-Lindel K, Forster A, Altermatt H.J, Greiner R, Gruber G. *Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: no evidence of a viral etiology in a group of Swiss women*. Breast. 2007;16(2):172-7.

21-Ostrow R.S, Manias D.A, Fong W.J, Zachow K.R, Faras A.J. *A Survey of human papillomavirus DNA by filter hybridization.* Cancer. 1987. 59:429-434

22-Khan N.A, Castillo A, Koriyama C, Kijima Y, Umekita Y, Ohi Y, et al. *Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan.* Br J Cancer. 2008. (3):408-14.

23-Cazzaniga M, Gheit T, Casadio C, Khan N, Macis D, Valenti F, et al. *Analysis of the presence of cutaneous and mucosal papillomavirus types in ductal lavage fluid, milk and colostrum to evaluate its role in breast carcinogenesis.* Breast Cancer Res Treat. 2009 ;114(3):599-605

24-Choi Y.L, Cho E.Y, Kim J.H, Nam S.J, Oh Y.L, Song S.Y, et al. *Detection of Human Papillomavirus DNA by DNA Chip in Breast Carcinomas of Korean Women*. 2007;28(6):327-32. 2008 4.

25-Wei Y.C, Chou Y.S, Chu T.Y. *Detection and typing of minimal human papillomavirus DNA inplasma*. Int J Gynaecol Obstet. (2007). 96:112–116

26-Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, Voravud N, Niruthisar d.S, Mutirangura A. *Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer*. BMC. cancer(2001)1:2

27-Doorbar J. *The papillomavirus life cycle* .J Clin Virol. (2005). 32 (Suppl1):S7–S15