

# SERVİKAL SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE YÜKSEK RİSKLİ İNSAN PAPILOMA VİRUS TİPLERİNE AİT E6/E7 mRNA'LARININ TİCARİ OTOMATİZE BİR NASBA SİSTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

## INVESTIGATION OF E6/E7 mRNAs OF HIGH RISK HUMAN PAPILOMA VIRUS TYPES BY A COMMERCIAL AUTOMATIZED NASBA ASSAY IN CERVICAL SWABS

Nurittin ARDIÇ<sup>1</sup>, Oktay ÖZTÜRK<sup>1</sup>, Koray ERGÜNAY<sup>2</sup>, Ogün SEZER<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Hipokrat Laboratuvarları Görüntüleme Merkezi, İstanbul.

<sup>2</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (ekoray@hacettepe.edu.tr)

<sup>3</sup> GATA Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Servisi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

### ÖZET

Yüksek riskli insan papilloma virus (HPV)'ları servikal kanser ve öncül lezyonları ile ilişkilidir. Sitolojik taramalara ek olarak birçok moleküler yöntem de tanı ve takipte önemli rol oynamaktadır. Servikal örneklerde HPV-DNA saptanmasında kullanılan nükleik asit testlerinde genellikle viral genomun korunmuş L1 bölgesini hedef alan konsensus polimeraz zincir reaksiyonu kullanılmaktadır. Buna alternatif olarak HPV'nin onkogenik proteinleri olan E6 ve E7'ye ait mRNA'ların saptandığı tanısal yöntemler de geliştirilmiştir. Bu çalışmada, yüksek riskli HPV tipleri olan tip 16, 18, 31, 33 ve 45'e ait E6/E7 mRNA'larının kalitatif olarak saptayan ticari bir nükleik asit dizi temelli çoğaltma (Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA) sistemi (NucliSENS EasyQ HPV™; bioMérieux, Fransa) kullanılarak servikal örneklerde HPV varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya jinekolojik muayenede şüpheli lezyonları bulunan 57 kadından sıvı bazlı inceleme sistemi (ThinPrep™ Pap Smear Method, Cytoc, ABD) ile alınan servikal sürüntü örnekleri dahil edilmiş ve nükleik asit saflaştırma işlemleri otomatize ticari bir sistem (NucliSENS easy-MAG™, bioMérieux, Fransa) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada, örneklerin %38.6'sında (22/57) HPV E6/E7 mRNA pozitifliği bulunmuş, pozitif örneklerde %50 (11/22) oranı ile tip 33 en sık rastlanılan tip olmuş, bunu %41 (9/22) ile tip 16, %22.7 (5/22) ile tip 31, %18.2 (4/22) ile tip 45 ve %4.5 (1/22) ile tip 18 izlemiştir. Pozitif bulunan örneklerin %63.6'sında (14/22) tek HPV tipiyle, %36.4'ünde (8/22) ise 2 HPV tipiyle enfeksiyon saptanmış, koenfeksiyonların %13.6 (3/22) oranıyla en sık tip 16 ve tip 33 birlikteliği ile ortaya çıktığı izlenmiştir. Sonuç olarak HPV E6/E7 mRNA'larının saptanmasına yönelik NucliSENS EasyQ HPV yöntemi ile ilk kez gerçekleştirilen bu ön çalışma verilerinin, daha geniş kapsamlı ve karşılaştırmalı araştırmalar ile desteklenmesi gerekmekte ve bu sistemin ülkemizdeki tanısal laboratuvarlar açısından performansının tam olarak ortaya konulabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** İnsan papilloma virusu, HPV, tiplendirme, NASBA, E6/E7 mRNA.

## ABSTRACT

High-risk human papillomaviruses (HPV) are associated with the development of cervical cancer and its precursor lesions. In addition to cytological screening, nucleic acid testing is the mainstay of diagnosis and follow-up. The molecular tests used for the detection of HPV-DNA in cervical specimens, usually rely on consensus polymerase chain reaction assays that target L1 region of the viral genome. Diagnostic assays that monitor mRNAs from HPV oncogenic proteins, E6 and E7, have also been recently developed. This study was aimed to detect E6/E7 mRNAs from high-risk HPV types 16, 18, 31, 33 and 45 qualitatively by a commercial Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) assay (NucliSENS EasyQ HPV™; bioMérieux, France) from cervical specimens. Cervical smear samples were collected from 57 women who had suspected lesions in gynecologic examination and transported by a commercial liquid-based cytology system (ThinPrep™ Pap Smear Method, Cytoc, USA). Nucleic acid purification was performed by an automated commercial station (NucliSENS easyMAG™, bioMérieux, France) as directed by the manufacturer. Presence of viral E6/E7 mRNAs were detected in 38.6% (22/57) of the samples. HPV type 33 mRNA was observed as the most common (11/22, 50%), followed by type 16 (9/22, 41%), 31 (5/22, 22.7%), 45 (4/22, 18.2%) and 18 (1/22, 4.5%). Single and multiple infections with 2 HPV types were identified in 63.6% (14/22) and of 36.4% (8/22) of the positive samples, respectively. The most common co-infection pattern was observed as HPV type 16 and 33 that comprised 13.6% (3/22) of the positive samples. This study was conducted as a preliminary evaluation of commercial NASBA E6/E7 mRNA testing in routine molecular microbiology applications. More studies are required to fully assess the performance of the system for diagnostic laboratories in Turkey.

**Key words:** Human papilloma virus, HPV, typing, NASBA, E6/E7 mRNA.

## GİRİŞ

İnsan papilloma virusu (human papilloma virus, HPV) tarafından oluşturulan enfeksiyonlar, tüm dünyada önde gelen seksüel geçişli hastalıklar arasındadır. HPV enfeksiyonu, deri ve çeşitli bölgelerde siğillere ve anogenital bölgenin bazı kanserlerine neden olur. Ayrıca bazı HPV tipleri, kadınlarda en sık izlenen kanserlerden birisi olan servikal kanserin etyolojisinde de rol oynamaktadır<sup>1,2</sup>.

Çembersel DNA genomunun %10'luk bölümü kontrol bölgelerini taşıırken, geri kalan kısmı erken (early, E) ve geç (late, L) proteinlerini kodlar. Virusun erken proteinlerinden olan E6 ve E7'nin hüresel transformasyondan sorumlu temel proteinler olduğu bilinmektedir<sup>3</sup>. Günümüzde 200'ü aşkın HPV tipinin var olduğu kabul edilmekte ve epidemiyolojik veriler temel alınarak serviks ve diğer kanserlerle ilişkilerine göre yüksek riskli/onkogenik, muhtemel yüksek riskli ve düşük riskli olarak gruplandırılmaktadır<sup>4,5</sup>. HPV'nin yüksek/muhtemel yüksek riskli tiplerinin serviks yassı hücreli kanseri ve onun öncül lezyonu servikal intraepitelial neoplazi ile ilişkili olması nedeniyle serviks kanseri açısından risk taşıyan kişilerin belirlenmesi ve uygun klinik takibin gerçekleştirilmesi için, rutin sitolojik taramalara ek olarak HPV enfeksiyonu varlığı ve etken tipin saptanması yaklaşımı uluslararası kabul görmüştür<sup>6</sup>.

HPV standart hücre kültürü sistemlerinde üretilmemektedir; serolojik testlerin ise tıpta kullanımları çok kısıtlıdır. Bu nedenle özellikle servikal örneklerde HPV varlığının gösterilmesi ve etken tiplerin belirlenebilmesi amacıyla hemen hemen sadece moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla farklı moleküler tekniklere dayanan "in ho-

use" ve ticari birçok tanı testi bulunmaktadır<sup>7</sup>. Bu çalışmada, NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) yöntemine dayanan ticari bir otomatize sistem ile servikal sürüntü örneklerinde yüksek riskli HPV tiplerine ait E6 ve E7 mRNA'larının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Aralık 2007-Şubat 2008 tarihleri arasında serbest çalışan uzman jinekologlar tarafından değerlendirilerek, jinekolojik muayenede şüpheli lezyonları bulunan 57 kadından, bilgilendirme ve sözel onayı takiben ticari sıvı bazlı inceleme sistemi (ThinPrep™ Pap Smear Method, Cytyc, ABD) kullanılarak alınan servikal sürüntü örnekleri dahil edildi. Olgulara ait demografik veriler ve sitolojik inceleme sonuçları kişisel olmaları nedeniyle değerlendirilmeye alınmadı.

Örneklerden DNA/RNA saflaştırma işlemleri, silika temelli bir metod ile, sistem için optimize edilmiş tam otomatize bir saflaştırma platformu (NucliSENS easyMAG, bioMérieux, Fransa) kullanılarak yapıldı<sup>8</sup>. Sonuçta 1 mM Tris-HCl (pH: 8.5) içinde 40-50 µl nükleik asit elde edildi ve çalışılncaya kadar -80°C'de saklandı.

Örneklerde onkogenik HPV tiplerinin varlığı; tip 16, 18, 31, 33 ve 45'in E6/E7 proteinlerine ait mRNA'ların NASBA yöntemiyle izotermal ve multipleks olarak amplifiye edildiği ticari NucliSENS EasyQ HPV (bioMérieux, Fransa) sistemi ile araştırıldı. Bu sistemde, çoğaltılan hedef RNA'ların saptanmasında, 3' ve 5' uçları birbirlerine komplementer olup florofor ve baskılayıcı molekülleri taşıyan, bunun dışında kalan kısımları ise çoğaltılan hedefe komplementer olan tek iplikli oligonükleotid problar (molecular beacon) kullanılmaktadır. Hedefle hibridizasyon sonucu probun sekonder yapısı açılmakta, böylece baskılayıcının etkisinden kurtulan floroforun sinyali sistem tarafından saptanabilmektedir<sup>3</sup>.

Yöntemin uygulanmasında, her örnek için her biri 2 primer ve prob içeren (U1A/HPV 16, HPV 33/45 ve HPV 18/31) 3 farklı reaksiyon karışımı üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlandı. Amplifikasyon sinyalleri gerçek zamanlı olarak 41°C'de 2.5 saat boyunca saptandı ve EasyQ™ analiz yazılımı ile değerlendirildi<sup>9</sup>. Sistemin analitik duyarlılığı HPV 16 için 0.1 nM, HPV 18 ve 45 için 10nM olarak belirtilmekteydi<sup>9</sup>.

Çalışmada üretici tarafından sağlanan standart HPV tip 16, 18, 31, 33 ve 45 oligonükleotidleri pozitif kontrol olarak, RNaz içermeyen su negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekte bulunan RNA'ların yapısal bütünlüklerinin kontrolü amacıyla da, düşük kopya sayılı bir "housekeeping" geni olan insan U1 küçük nükleer ribonükleoproteinine özgül protein A (U1A) internal kontrol olarak kullanıldı<sup>9</sup>. U1A mRNA'sına ait pozitif sonuç alındığında sonuçlar geçerli olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmamızda 57 örneğin 22 (%38.6)'sinde HPV E6/E7 RNA'sı saptanmıştır (Tablo I). Pozitif örneklerin %50'sinin (11/22) tip 33, %41'inin (9/22) ise tip 16 olduğu görülmüş, bunları sırasıyla tip 31 (5/22, %22.7), tip 45 (4/22, %18.2) ve tip 18 (1/22, %4.5) izlemiştir.

**Tablo I.** Çalışılan Örneklerde HPV Tiplerinin Dağılımı (n= 57)

HPV tipleri	Sayı	%
Tip 16	9	15.8
Tip 18	1	1.8
Tip 31	5	8.8
Tip 33	11	19.3
Tip 45	4	7
Toplam	22	38.6

HPV: İnsan papilloma virus.

**Tablo II.** Pozitif Örneklerde Gözlenen Tekli veya Çoklu HPV Tiplerinin Dağılımı

HPV tipleri	Sayı	%
Tip 16	4	18.2
Tip 18	-	-
Tip 31	4	18.2
Tip 33	5	22.7
Tip 45	1	4.5
Tip 16 + 33	3	13.6
Tip 33 + 45	2	9.1
Tip 16 + 31	1	4.5
Tip 18 + 33	1	4.5
Tip 16 + 45	1	4.5
Toplam	22	100

HPV: İnsan papilloma virus.

HPV pozitif örneklerin %63.6'sında (14/22) tek viral tipe enfeksiyon, %36.4'ünde (8/22) ise 2 viral tipe koenfeksiyon saptanmıştır (Tablo II). Koenfeksiyonların en sık tip 16 ve 33 birlikteliği ile ortaya çıktığı izlenmiştir (3/22; %13.6) (Tablo II).

## TARTIŞMA

HPV enfeksiyonlarının tanımlanması ve tiplendirilmesi, servikal kanser gelişiminin önlenmesi ve takibi için büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla sitolojik inceleme ile birlikte hibridizasyon ve amplifikasyona dayalı birçok nükleik asit testleri yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>7</sup>. Ancak HPV-DNA testleri tek başına normal sitoloji izlenen kişileri, tedavi gerektiren ileri sitolojik atipi gösteren kişilerden ayıramamakta, varsa lezyonun ilerleme veya onkogenik potansiyeli konusunda bilgi vermemektedir. Bu durumun sonucu olarak, kendiliğinden iyileşecek veya hiç farkedilmeyecek lezyonların tanı alması söz konusu olmakta; böylece gereksiz kolposkopi ve tedavi uygulamalarına bağlı olarak maliyet arta-

bilmektedir<sup>3,10</sup>. Son yıllarda HPV'nin onkojenik etkisinden sorumlu olan E6 ve E7 proteinerine ait mRNA'ların saptanmasının, klinik gidişle daha uyumlu olduğu ifade edilmektedir<sup>11,12</sup>.

Sunulan çalışmada, jinekolojik incelemesinde şüpheli lezyonları olan kadınlardan alınan servikal sürüntü örneklerinde NASBA temelli yeni bir ticari yöntem ile (NucliSENS EasyQ HPV; bioMérieux, Fransa) onkojenik HPV tiplerine ait E6/E7 RNA'larının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamız, ulaşabildiği kadarıyla, bu yöntemle elde edilen verilerin ortaya konulduğu ülkemiz kaynaklı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızda kullanılan yöntem, hedef RNA'ların NASBA yöntemi ile amplifikasyonu ve saç tokası yapılı "molecular beacon"larla gerçek zamanlı ve kalitatif olarak saptanması esasına dayanmaktadır. Yöntemin validasyonu ile ilgili çalışmaların sonuçları yayınlanmış ve performans özellikleri belirlenmiştir<sup>9</sup>. Aynı sistem İskandinav ülkelerinde farklı bir isimle (PreTect™ HPV-Proofer; NorChip, Norveç) pazarlanmaktadır<sup>9</sup>.

Çalışmamızda servikal sürüntü örneklerinde HPV prevalansı %38.6 (22/57) olarak saptanmıştır. Ülkemizde HPV prevalansının araştırıldığı çalışmalar sınırlı olup, incelenen grup ve yönetime bağlı olarak bu oranlar %2-80 arasında değişmektedir<sup>13-20</sup>. Ülkemize ait HPV tip dağılımı verileri incelendiğinde ise, en sık tip 16 (%37.8-54.5)'ya rastlandığı, bunu tip 18 (%9.2-45)'in izlediği görülmektedir<sup>17,18,20-23</sup>. Tüm dünyada normal veya atipi izlenen örneklerde en sık rastlanılan tipin genellikle tip 16 olduğu; coğrafi bölgeler arasındaki farklılıkların HPV-16 sıklığında ve bunu izleyen tiplerin sıralamasında olduğu vurgulanmaktadır<sup>24,25</sup>. Bizim çalışmamızda en sık saptanan tip HPV-33 (%50) olmuş, HPV-16 ise %41'lik oran ile 2. sırayı almıştır. Diğer tiplerin sıralaması da; tip 31 (%22.7), tip 45 (%18.2) ve tip 18 (%4.5) şeklindedir. Örneklerin %36.4'ünde birden fazla HPV tipi saptanmış; tip 33'ün %27.3 (6/22) oranında, tip 16'nın ise %22.7 (5/22) oranında diğer tiplerle birlikte koenfeksiyon oluşturduğu dikkati çekmiştir (Tablo II). Ko-enfeksiyonların saptanmasında, örnekte bulunan her HPV tipi için tanı yönteminin saptama duyarlılığındaki farklılıkların, örnekteki tiplerin farklı kopya sayılarında bulunmasının ve varyantların varlığının sonuçlara etkisi olabileceği belirtilmektedir<sup>26</sup>. Çalışmamızda kullanılan yöntemle ise sadece sık karşılaşılan 5 yüksek riskli HPV tipi (16, 18, 31, 33, 45) belirlenebilmektedir. Bu nedenle örneklerimizde mevcut olabilecek diğer tiplerin saptanması mümkün olamamıştır.

Yapılan çalışmalarda, HPV E6/E7 mRNA düzeylerinin genel olarak DNA saptama, viral yük ya da integrasyon tespitine göre klinikle daha uyumlu sonuçlar verdiği belirtilmektedir<sup>11</sup>. Serviks kanseri olgularında da yüksek E6/E7 mRNA düzeylerinin kötü prognozla ilişkisi saptanmış, E6/E7 mRNA ekspresyonu ile viral yük arasında korelasyon olmadığı ortaya konulmuştur<sup>12,27</sup>. Tüm bu sonuçlar, HPV E6/E7 mRNA saptanmasına yönelik testlerin servikal lezyonun ağırlığı ile daha iyi korelasyon gösterdiğini ve serviks kanseri gelişiminin öngörülmesinde önemli potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir<sup>3</sup>.

Çalışmamızın sınırlayıcı yönleri; görece olarak az sayıda (n= 57) örneğin incelenmiş olması, olgulara ait sitolojik takip sonuçlarının elde edilememiş olması ve örneklerin alternatif bir yöntemle incelenmemiş olması olarak sayılabilir. Bununla birlikte sistemin uygu-

lama ve performansının ülkemizde ilk kez değerlendirilmiş olması, ayrıca önceki çalışmalarda da dikkat çekildiği üzere HPV koenfeksiyonlarındaki yüksek oranların desteklenmesi önemlidir. Sistemde 24 örnek için sonuçların alınması, 1 saatlik manuel uygulama da dahil olmak üzere yaklaşık 4.5 saat sürmektedir. Sistemin tanısal moleküler test olarak CE-IVD onayına sahip olması, rutin kullanım için bir avantaj olmaktadır. Ancak yöntemde RNA amplifikasyonu yapılması nedeniyle uygulama sırasında örnek alma, taşıma ve saklama koşullarının optimizasyonu kesin olarak gereklidir. Yapılan bir çalışmada, -70°C'de saklanması koşuluyla uygun ortamdaki örneklerin 12 ay boyunca stabilitesini koruyabildiği rapor edilmiştir<sup>28</sup>.

Sonuç olarak, HPV E6/E7 mRNA'larının saptanmasına yönelik NucliSENS EasyQ HPV (bioMérieux, Fransa) yöntemi ile gerçekleştirdiğimiz bu ön çalışmanın, ülkemiz koşullarında bu sistemin sağlayacağı avantaj ve dezavantajların kesin olarak ortaya koyulabilmesi için yapılacak olan daha geniş kapsamlı ve karşılaştırmalı çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

## TEŞEKKÜR

Yazarlar, katkılarından dolayı Biyolog Gözen Özilhan'a teşekkür eder.

## KAYNAKLAR

1. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Can Med Assoc J* 2001; 164: 1017-25.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-50.
3. Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 405-15.
4. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005; 32: 1-6.
5. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
6. Cronje HS. Screening for cervical cancer in developing countries. *Int J Gynecol Oncol* 2004; 84: 101-8.
7. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 43-51.
8. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.
9. Tor Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrom T, Karlsen F. PreTect™ HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J Virol Methods* 2007; 142: 204-12.
10. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007; 375: 1589-97.
11. Andersson S, Hansson B, Norman I, et al. Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol* 2006; 29: 705-11.
12. de Boer MA, Jordanova ES, Kenter GG, et al. High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 132-8.
13. Ozcelik B, Serin IS, Gokahmetoglu S, Basbug M, Erez R. Human papillomavirus frequency of women at low risk of developing cervical cancer: a preliminary study from a Turkish university hospital. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24: 157-9.

14. Inal MM, Köse S, Yıldırım Y, et al. The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 1266-70.
15. Ozturk S, Kaleli I, Kaleli B, Bir F. Investigation of human papillomavirus DNA in cervical specimens by hybrid capture assay. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38: 223-32.
16. Guney AI, Ince U, Kullü S, Pekin S, Cirakoglu B. Detection and typing of human papillomavirus in cervical specimens of Turkish women. *Eur J Gynecol Oncol* 1997; 18: 546-50.
17. Ergunay K, Misirlioglu M, Firat P, et al. Detection and typing of human papilloma virus by polymerase chain reaction and hybridization assay in cervical samples with cytological abnormalities. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42: 273-82.
18. Ergunay K, Misirlioglu M, Pinar F, Tuncer ZS, Tuncer S, Ustacelebi S. Investigation of human papilloma virus DNA in cervical samples with cytological abnormalities and typing of the virus. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 219-26.
19. Vardar MA, Altintas A, Doran F, et al. Human papillomavirus detection in cervical smears and cervical tissue excised by the Loop Electrosurgical Excision Procedure (LEEP). Diagnostic value of cytology, colposcopy and histology. *Eur J Gynecol Oncol* 1995; 16: 494-9.
20. Erensoy S, Erhan Y, Zeytinoglu A, Ozacar T, Ozdemir N, Bilgic A. DNA in situ hybridization in the diagnosis of human papillomavirus infection. *Clin Diagn Virol* 1996; 5: 219-23.
21. Tuncer S, Ustaçelebi Ş. Servikal biyopsi örneklerinde insan papillomavirusları tip 16 ve 18'in polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Flora* 1996; 1: 40-4.
22. Karaloglu D, Yazici H, Alatli C, et al. Detection of HPV 16 and HPV 18 infection in patients with cervical neoplasia. *Eur J Gynecol Oncol* 1996; 17: 296-8.
23. Onan MA, Taskiran C, Bozdayi G, et al. Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26: 632-5.
24. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88: 63-73.
25. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24: 26-34.
26. Gillio-Tos A, De Marcoa L, Ghisetti V, et al. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. *J Clin Virol* 2006; 36: 126-32.
27. Wang-Johanning F, Lu DW, Wang Y, Johnson MR, Johanning GL. Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using real-time polymerase chain reaction analysis. *Cancer* 2002; 94: 2199-210.
28. Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygard JF, Hagmar B. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4.136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 367-72.