

Servikal Sürüntü Örneklerinde İki Farklı Yöntemle HPV-DNA Varlığının Araştırılması: MY09/11 Konsensus PCR ve Tipe Özgül Gerçek Zamanlı PCR

Investigation of HPV-DNA in Cervical Smear Samples by Two Different Methods: MY09/11 Consensus PCR and Type-Specific Real-Time PCR

Fatih ŞAHİNER¹, Ramazan GÜMRAL¹, Kenan ŞENER¹, Nuri YİĞİT²,
Murat DEDE³, Mehmet YAPAR¹, Ayhan KUBAR¹

¹ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Gulhane Military Academy of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Gulhane Military Academy of Medicine, Department of Medical Pathology, Ankara, Turkey.

³ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Ankara.

³ Gulhane Military Academy of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 30.03.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 09.05.2012

ÖZET

İnsan papillomavirus (HPV) ile ilişkisi kanıtlanmış olan servikal kanser, kadınlar arasında dünya genelinde ikinci en sık görülen kanserdir ve gelişmekte olan ülkelerde kansere bağlı ölümlerin önemli nedenlerinden biridir. HPV enfeksiyonunun başlangıcı ile servikal kanser gelişimi arasında uzun bir latentlik döneminin bulunması nedeniyle servikal kanserler tarama programlarıyla erken evrelerde saptanabilmektedir. Günümüzde servikal kanser tarama programlarının önemli bir parçası olan HPV-DNA testleri dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, biri MY09/11 konsensus gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) ve diğeri tipe özgül Rt-PCR olmak üzere iki farklı yöntem ile 356 servikal sürüntü örneğinde HPV-DNA varlığı araştırılmıştır. Konsensus PCR sonucuna bakılmaksızın tüm örnekler tipe özgül PCR ile ayrıca test edilmiştir. Tipe özgül PCR analizleri, ikisi düşük riskli HPV ve 11'i yüksek riskli HPV olmak üzere toplam 13 farklı HPV tipi için dizayn edilen özgün primerler ve TaqMan probolar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemden en az biri ile HPV-DNA pozitif olarak değerlendirilen 109 (%30.6) sürüntü örneğinde 95 yüksek riskli HPV, 39 düşük riskli HPV ve tip tayini yapılamayan sekiz izolat olmak üzere toplam 142 farklı izolat tanımlanmıştır. Saptanma sıklığına göre yüksek riskli HPV tipleri sırasıyla şu şekildedir: HPV-16; 32 (%33.7), HPV-52; 12 (%12.6), HPV-58; 11 (%11.6), HPV-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Fatih Şahiner, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, 06018 Etlik, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 304 3481, **E-posta (E-mail):** fsvirol@gmail.com

18; 7 (%7.4), HPV-31; 7 (%7.4), HPV-35; 7 (%7.4), HPV-68; 6 (%6.3), HPV-33; 4 (%4.2), HPV-82; 4 (%4.2), HPV-39; 3 (%3.2) ve HPV-45; 2 (%2.1). Eş zamanlı sitopatolojik inceleme sonuçlarına göre örneklerin 84 (%23.6)'ünde çeşitli sitolojik atipilerin raporlandığı belirlenmiştir. Tıp tayini yapılamayanlar hariç olmak üzere 101 örneğin 72 (%71.3)'ünde tek, 29 (%28.7)'unda birden fazla HPV tipi izole edilmiştir. HPV-18, HPV-33 ve HPV-35 çoklu enfeksiyonlarda tekli enfeksiyonlara göre sırasıyla 7.4, 3.7 ve 3.0 kat olmak üzere daha yüksek oranlarda saptanmıştır. Tipe özgül PCR ile HPV-DNA varlığı saptanan 101 örneğin 24 (%23.8)'ünde MY09/11 konsensus primerleri ile HPV-DNA saptanamamıştır. Bu nedenle, sadece konsensus primerlerle HPV-DNA varlığının araştırılmasının, HPV enfeksiyonlarının tanı, tedavi ve takibini yönetmede yetersiz bir yaklaşım olacağı düşünülmüştür. Sürüntü örneklerinin öncelikli olarak konsensus primerler ile değerlendirilmesi ve pozitif örneklerde tiplendirme analizlerinin yapılması, dünya genelinde en çok başvurulan tanı-tarama stratejisidir. Bu durum göz önüne alındığında, ülkemizde ve dünyada mevcut prevalans verilerinin yeni nesil tanı-tarama testlerinin kullanıldığı geniş çaplı çalışmalarla güncellenmesine gereksinim olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Insan papillomavirusu; HPV; PCR; servikal sürüntü; genotiplendirme.*

ABSTRACT

Cervical cancer that has been proven to be associated with human papillomavirus (HPV) is the second most common cancer in women worldwide and is a leading cause of cancer deaths in women in developing countries. Cervical cancers can be detected in the early stages by screening programs since a long latency period exists between the beginning of HPV infection and the development of cervical cancer. HPV-DNA testing is widely used throughout the world and today is an important part of cervical cancer screening programs. In this study, we analyzed the presence of HPV-DNA in 356 cervical smear samples by two different methods which are MY09/11 consensus real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) and type-specific Rt-PCR. All samples were also tested by type-specific PCR, regardless of consensus PCR results. PCR analysis were performed using the type-specific primers and TaqMan probes that were designed for a total of 13 different HPV types; two low risk HPV and 11 high risk HPV types. A total of 142 different isolates, 95 being high risk HPV isolates, 39 low risk HPV isolates and eight unidentified isolates, were determined in 109 (30.6%) smear samples that were defined as HPV-DNA positive by at least one of the two methods. Frequencies of detection of high risk HPV types in HPV-positive samples were as follows respectively: HPV-16; 32 (33.7%), HPV-52; 12 (12.6%), HPV-58; 11 (11.6%), HPV-18; 7 (7.4%), HPV-31; 7 (7.4%), HPV-35; 7 (7.4%), HPV-68; 6 (6.3%), HPV-33; 4 (4.2%), HPV-82; 4 (4.2%), HPV-39; 3 (3.2%) and HPV-45; 2 (2.1%). Various cytologic atypia were reported in 84 (23.6%) smear samples according to the simultaneously performed cytopathologic examination. Single HPV type was detected in 72 (71.3%) and multiple HPV types were detected in 29 (28.7%) of 101 smear samples with the exception of the unidentified isolates by type-specific RtPCR. HPV-18, HPV-33 and HPV-35 had higher detection rates of 7.4, 3.7 and 3.0 fold in mixed infections than single ones, respectively. HPV-DNA could not be detected by MY09/11 consensus primers in 24 (23.8%) of 101 cervical smear samples that were accepted as HPV-DNA positive by type-specific PCR. Thus, investigation of the presence of HPV-DNA by only consensus primers would be insufficient for the diagnosis, treatment and follow-up of HPV infections. Initial assessment of smear samples by using consensus primers and genotyping only positive samples seem to be the most practical strategy for the diagnosis and screening of HPV infections throughout the world. When this situation is taken into consideration, we think that the current prevalence data in our country and around the world must be updated by using large-scale studies that apply new generation screening and diagnostic tests.

Key words: *Human papillomavirus; HPV; PCR; cervical smear; genotyping.*

GİRİŞ

İnsan papillomavirusları (HPV), küçük (50-55 nm), zarfsız, ikozahedral simetrik DNA viruslarıdır¹. Servikal kanser ve HPV arasındaki etyolojik ilişki kanıtlandıktan sonra HPV tipleri onkogenik risk potansiyellerine göre yüksek riskli tipler (HR-HPV), muhtemel yüksek riskli tipler (PrHR-HPV) ve düşük riskli tipler (LR-HPV) şeklinde gruplandırılmıştır¹. Servikal kanser için yüksek riskli olduğu bilinen HPV tipleri (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) benzer şekilde diğer anogenital kanserlerle de (vulvar, anal ve penil kanserler gibi) ilişkilidir². Genel olarak en sık rastlanan HR-HPV tipi HPV-16 iken, HPV-6 ve HPV-11 ise anogenital bölge enfeksiyonlarında en sık izole edilen LR-HPV tipleridir.

HPV prevalansı bölgelere göre değişmekle beraber dünya genelinde asemptomatik ve normal sitolojili kadınlarda sırasıyla yaklaşık %2-44 ve %7-24 oranlarında bulunmuştur^{3,4}. HPV enfeksiyonları yüksek viral klerens oranına sahiptir ve enfeksiyonu takiben 12 ay içinde olguların yaklaşık %70'inde, 18 aydan sonra ise %80'in üzerinde HPV-DNA saptanmaktadır^{5,6}. Bununla beraber HPV ile ilişkili servikal kanser tüm dünyada kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında yine ikinci sırada yer almaktadır^{5,7}. Dünyada her yıl yeni tanımlanan servikal kanser olgu sayısının yaklaşık 500.000 olduğu ve bunların yarısına yakınının ölümle sonuçlandığı tahmin edilmektedir^{5,8}. Ülkemizde ise HPV enfeksiyonlarıyla ilgili çalışmalar belirli gruplarda ve sınırlı popülasyonlarda yapıldığından gerçek prevalansı belirlemek zordur. Ancak bu çalışmalara ait veriler değerlendirildiğinde prevalansın %2-6 arasında olduğu tahmin edilmektedir⁹. Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde serviks kanseri, kadınlarda görülen kanserler arasında 1996, 2002 ve 2003 yıllarında sırasıyla 7., 10. ve 9. sıralarda yer almaktadır⁷.

HR-HPV enfeksiyonunun başlangıcıyla servikal kanser gelişimi arasında genellikle 10 yıl veya daha uzun süren bir latentlik döneminin olması nedeniyle, Pap smear ve HPV-DNA testlerinin kullanıldığı tarama programları, servikal kanserlerin önlenmesi ve erken tanısında büyük önem taşımaktadır². HPV enfeksiyonlarının yayılımını önlemede etkin bir yol da aşılamadır. Gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalarla, Pap ve HPV-DNA testleriyle kombine edilen profilaktik HPV aşılarının yaygın kullanımı ile HPV enfeksiyonları ve ilişkili kanserlere bağlı morbidite ve mortalitenin maliyet-etkin bir şekilde azaltılabileceği gösterilmiştir^{2,5}. Ancak HPV aşılarının nispeten pahalı olması, sadece aşı hedefinde bulunan HR-HPV tiplerine karşı koruyucu olması ve koruyuculuk sürelerinin bilinmemesi nedeniyle aşılamayla ilgili bazı çekinceler bulunmaktadır².

Bu makalede çeşitli sitolojik atipilere eşlik eden HPV tipleri araştırılmış ve ülkemizde yapılan diğer çalışma verileriyle karşılaştırılmıştır. Çalışma grubumuz küçük olmakla beraber HPV-DNA pozitifliğinin, HR-HPV varlığının ve çoklu enfeksiyonların atipik transformasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, HPV enfeksiyonlarının tanısında kullanılan bazı HPV-DNA saptama-tiplendirme yöntemlerinin ve yaklaşımlarının etkinlikleri araştırılmış ve yöntem seçiminin prevalans verileri ve özellikle de aşı etkinliğinin öngörülmesi üzerine olası etkilerine dikkat çekilerek yeni yapılacak çalışmalara yön verebilecek bilimsel verilere katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya 2009-2011 yılları arasında HPV-DNA varlığı yönünden incelenmek üzere rutin analizler için laboratuvarımıza gönderilen 356 servikal sürüntü örneği dahil edildi ve aynı hastaya ait tekrarlayan örnekler çalışma kapsamına alınmadı. Eksfoliye servikal hücreler sıvı bazlı ticari bir sistem (BD SurePath™ Pap Test, ABD) ile toplandı ve örnekler modifiye Bethesda sistemine göre sitolojik incelemeye tabi tutuldu¹⁰.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulamaları için DNA izolasyonu, standart alkali fenol-kloroform-izoamil alkol ekstraksiyon yöntemiyle yapıldı¹¹.

Konsensus PCR Reaksiyonları

İlk olarak daha önce tanımlanmış bir yöntem olan MY09/11 dejenere primerlerinin kullanıldığı SYBR green temelli gerçek zamanlı (real-time) PCR (Rt-PCR) testiyle örneklerde HPV-DNA varlığı araştırıldı¹². PCR döngüleri tamamlandıktan sonra, ısı artışı 0.1°C/saniye olacak şekilde reaksiyon tüpleri 55°C'den 95°C'ye ısıtılarak erime eğrisi (melting curve) döngüsü uygulandı. Optimizasyon çalışmalarıyla MY09/11 primerleri için pozitif zirve değeri (melting temperature, T_m); 82 ± 1.5°C olarak belirlendi ve T_m değeri bu aralıkta yer alan örnekler HPV-DNA varlığı yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Tipe Özgül PCR Reaksiyonları

Örneklerde HPV-DNA varlığının araştırılmasında ikinci yöntem olarak konsensus PCR ile pozitiflik olup olmadığına bakılmaksızın toplam 13 farklı HPV tipi için (tip 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 68 ve 82) özgül olarak dizayn edilen primerlerin (Tablo I) ve problemlerin (Tablo II) kullanıldığı TaqMan temelli Rt-PCR yöntemi kullanıldı. Reaksiyon karışımı 1.25 U *hot start* taq DNA polimeraz (Bioron, Almanya), her bir primerden 10 pmol, 2.5 pmol TaqMan prob, dNTP miksten 0.2 mM ve 2.0 mM MgCl₂ içerecek şekilde hazırlandı ve PCR reaksiyonları 5 µl hedef DNA ilavesiyle toplam 25 µl hacimde gerçekleştirildi. Amplifikasyon döngüleri: (i) 95°C'de 10 dakika 1 döngü (*hot start* taq DNA polimeraz aktivasyonu için), (ii) 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakika olmak üzere 40 döngü olarak gerçekleştirildi. Tüm primer ve problemler OligoYap 4.0 yazılım programıyla dizayn edildi¹³. Dizilerin özgünlükleri internet yardımıyla GenBank'ın BLAST özelliğiyle kontrol edildi ve sentezlettiler (MWG-Biotech, Almanya). TaqMan problemlerin dizaynında floresan boya olarak 6-karboksi-4',5'-dikloro-2',7'-dimetoksi floresan (JOE) ve 6-karboksi floresan (FAM) kullanılırken, floresan olmayan boya olarak *black hole quencher* (BHQ) kullanıldı.

Her iki PCR yönteminde negatif kontrol olarak hedef DNA içermeyen bir örnek ve pozitif kontrol olarak da laboratuvarımız kolleksiyonunda bulunan örnekler kullanıldı. Internal kontrol olarak insan gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) gen gölgesini hedefleyen primerler ve özgün bir prob kullanıldı. Internal kontrol ile pozitiflik saptanmayan örnekler çalışma dışı bırakıldı.

Tipe Özgül PCR'nin Duyarlılığı

Saptama duyarlılığını (analitik duyarlılık) tespit etmek amacıyla yukarıda belirtilen primerlerle elde edilen HPV-16 ve HPV-18 ampikonları TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen,

Tablo 1. MY09/11, Internal Kontrol ve Tipe Özgül HPV Primerleri

Primerin adı	Primer dizisi*		Hedef gen bölgesi ve yaklaşık ampikon büyüklüğü
MY09 primeri	5'	cgccmarrggawactgatc	3' ~450 bp L1
MY11 primeri	5'	gcmcagggwcataayaatgg	3'
HPV-6/11 Primer 1	5'	gtatccaargttgttgccacggat	3' 130 pb L1
HPV-6 Primer 2	5'	gcacaacagttttgttagcccg	3'
HPV-6/11 Primer 1	5'	gtatccaargttgttgccacggat	3' 176 bp L1
HPV-11 Primer 2	5'	ggcaacactaccttaaacactcta	3'
HPV-16 Primer 1	5'	tgcacgcacaacatatattatcatg	3' 130 bp L1
HPV-16 Primer 2	5'	cctgtattgtaatcctgatactttag	3'
HPV-18 Primer 1	5'	ccaagtggctctattgttacctc	3' 130 bp L1
HPV-18 Primer 2	5'	gagtggatatctaccacagtaac	3'
HPV-31 Primer 1	5'	caggatatagggcagctccta	3' 159 bp L1
HPV-31 Primer 2	5'	cacatatacaatacagcacaagcac	3'
HPV-33 Primer 1	5'	gtaagcctccaacagggaac	3' 132 bp L1
HPV-33 Primer 2	5'	caaatcctgtgtccacatatcac	3'
HPV-35 Primer 1	5'	gcacaccttgtaatgctaaccag	3' 145 bp L1
HPV-35 Primer 2	5'	acatcacttttattagcttgaatgtag	3'
HPV-39 Primer 1	5'	gcgaagggtgtcaatactgatg	3' 127 bp L1
HPV-39 Primer 2	5'	cctgcttgcgaccaccattc	3'
HPV-45 Primer 1	5'	cactagcgctaataatgcgtgamac	3' 175 bp L1
HPV-45 Primer 2	5'	gtccacyacagtaacaacaactg	3'
HPV-52 Primer 1	5'	ctacagctcattaacagtgaatac	3' 136 bp L1
HPV-52 Primer 2	5'	ctggatacttacatacactgctac	3'
HPV-58 Primer 1	5'	atgcttatctatggattataaacaacac	3' 125 bp L1
HPV-58 Primer 2	5'	atggaggacaatcagtagcagct	3'
HPV-68 Primer 1	5'	ctctgactcccagttatttaacaag	3' 149 bp L1
HPV-68 Primer 2	5'	tagagtctgtagtagtggaacatg	3'
HPV-82 Primer 1	5'	gttatacaagggtgggattacta	3' 143 bp L1
HPV-82 Primer 2	5'	gkgacactggtgcaggtgga	3'
GAPDH- Primer 1	5'	tcctgcaccaccaactgcttag	3' 145 bp GAPDH
GAPDH- Primer 2	5'	catcacrccacagtytccagag	3'

* Primerlerdeki M, K, R, W ve Y kodları dejeneratif bazları göstermektedir. M;A/C, K;G/T, R;A/G, W;A/T ve Y;C/T olasılıklarını ifade eder.

Tablo II. *Tipe Özgül Problar ve Internal Kontrol İçin Dizayn Edilen Prob*

Prob adı	Floresan boya		Prob dizisi		Quencher
HPV-6/11 Prob	FAM	5'	cgcaccaacatattttatcatgccagcag	3'	BHQ
HPV-16 Prob	FAM	5'	ccagactacttgacagttggacatccc	3'	BHQ
HPV-18 Prob	JOE	5'	accatattggttacataaggcacagggtc	3'	BHQ
HPV-31 Prob	FAM	5'	aacgtagtgcaccctcagcatctacc	3'	BHQ
HPV-33 Prob	FAM	5'	tgttgctgtactaatgcagcacctgc	3'	BHQ
HPV-35 Prob	FAM	5'	tgacacaaatcctgtgtctaccatgtc	3'	BHQ
HPV-39 Prob	JOE	5'	acaggcatatattattatgctggcagctc	3'	BHQ
HPV-45 Prob	FAM	5'	tgtgtattccccttctcccagtggc	3'	BHQ
HPV-52 Prob	FAM	5'	acatggtagatacaggatttggtgcatgg	3'	BHQ
HPV-58 Prob	FAM	5'	tggctgtaaacctcccactggtgag	3'	BHQ
HPV-68 Prob	FAM	5'	tgacaaggcacaggacacacaacatg	3'	BHQ
HPV-82 Prob	FAM	5'	tgctgtcattagtacgccacaagcca	3'	BHQ
GAPDH-Prob*	FAM	5'	aggctatccatgacaacttggatcg	3'	BHQ

* GAPDH probundaki Y kodu dejeneratif baz yapısını göstermektedir. Y;C/T olasılıklarını ifade eder.

ABD) aracılığıyla plazmidlere klonlandı. Plazmid standartlarının hazırlanmasında hesaplamalar OligoYap 4.0 yazılım programıyla yapıldı. Testlerin saptama duyarlılıklarının dinamik aralıklarını belirlemek için plazmidlerin seri dilüsyonları (10^8 - 10^1 plazmid/ml) kullanıldı.

Tüm PCR işlemleri ve analizler ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, ABD) cihazıyla gerçekleştirildi.

BULGULAR

Çalışma grubu, yaşları 16-64 (ortalama: 37.9 ± 8.5 ; ortanca: 38) yıl arasında değişen hastalardan oluşmaktadır. Çalışmaya dahil edilen 356 servikal sürüntü örneğinin sekizinde sadece MY09/11 primerlerinin kullanıldığı konsensus PCR ile, 24'ünde sadece tipe özgül PCR ile ve 77'sinde her iki yöntemle olmak üzere toplam 109 (%30.6) örnekte HPV-DNA pozitifliği saptanmıştır. Her iki yöntemden en az biri ile HPV-DNA pozitif olarak değerlendirilen 109 örneğin 95'i HR-HPV, 39'u LR-HPV ve sekizi tiplendirilemeyen olmak üzere toplam 142 farklı izolat tanımlanmıştır. HPV-DNA pozitif olarak değerlendirilen örneklerde saptanan izolatların tekli ve çoklu tip dağılımları ve eş zamanlı olarak birlikte saptanan tipler ve bu tip birlikteliklerinin her iki yöntemle pozitif olarak saptanma durumu Tablo III'te gösterilmiştir. Tip tayini yapılan 95 HR-HPV izolatının sıklık sırasına göre dağılımı; 32 (%33.7) HPV-16, 12 (%12.6) HPV-52, 11 (%11.6) HPV-58, 7 (%7.4) HPV-18, 7 (%7.4) HPV-31, 7 (%7.4) HPV-35, 6 (%6.3) HPV-68, 4 (%4.2) HPV-33, 4 (%4.2) HPV-82, 3 (%3.2) HPV-39 ve 2 (%2.1) HPV-45 şeklindedir (Tablo IV).

Tip tayini yapılamayanlar hariç olmak üzere HPV-DNA pozitif 101 örneğin 72 (%71.2)'sinde tek, 29 (%28.7)'unda ise birden fazla HPV tipi izole edilmiştir. Çalışma-

Tablo III. Servikal Sürüntü Örneklerinde Saptanan HPV Tipleri ve Ko-Enfeksiyon Paternleri

Tekli enfeksiyon (n= 72)	HR-HPV/HR-HPV	Çoklu enfeksiyon (n= 29) HR-HPV/LR-HPV	LR-HPV/LR-HPV
Tip 6 (9)	Tip 16, 35 (3)	Tip 6, 52 (1)	Tip 6, 11 (7)
Tip 11 (11)	Tip 18, 52 (2)	Tip 6, 58 (1)	
Tip 16 (24)	Tip 31, 58 (2)	Tip 11, 33 (1)	
Tip 18 (1)	Tip 16, 33 (2)	Tip 6, 16, 35 (1)	
Tip 31 (3)	Tip 16, 18 (1)	Tip 11, 39, 68 (1)	
Tip 33 (1)	Tip 18, 31 (1)		
Tip 35 (2)	Tip 18, 35 (1)		
Tip 39 (1)	Tip 18, 58 (1)		
Tip 45 (2)	Tip 52, 58 (1)		
Tip 52 (6)	Tip 39, 68 (1)		
Tip 58 (4)	Tip 16, 52, 58 (1)		
Tip 68 (4)	Tip 31, 52, 58 (1)		
Tip 82 (4)			
ÖS: 72, İS: 72	ÖS: 17, İS: 36	ÖS: 5, İS: 12	ÖS: 7, İS: 14

(n): Tipe özgül PCR ile pozitif olarak değerlendirilen örnek sayısını göstermektedir,
ÖS: Örnek sayısı; İS: İzolat sayısı; HPV: Human papillomavirus; HR: Yüksek riskli; LR: Düşük riskli; PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

mızda sitolojik atipi ve HSIL görülme risklerinin (odds ratio; OR), çoklu enfeksiyonlarda tekli enfeksiyonlara göre sırasıyla 1.26 kat ve 1.3 kat arttığı bulunmuştur. Ayrıca, HPV-18, HPV-33 ve HPV-35 çoklu enfeksiyonlarda tekli enfeksiyonlara göre sırasıyla 7.4, 3.7 ve 3.0 kat olmak üzere daha yüksek oranlarda saptanmıştır.

HPV-16 ve HPV-18 amplikonlarının klonlandığı plazmidlerle hazırlanan standart dilüsyonların kullanıldığı reaksiyonlarda tipe özgül PCR'nin saptama duyarlılığı her iki plazmid için de 10 plazmid/reaksiyon olarak bulunmuştur.

Sitopatolojik incelemelerde 356 örneğin 84 (%23.6)'ünde çeşitli sitolojik atipiler izlenmiş; bunların 45 (%53.6)'i LSIL, 20 (%23.8)'si HSIL, 14 (%16.7)'ü ASC-US, 4 (%4.8)'ü ASC-H ve 1 (%1.1)'i AGC olarak değerlendirilmiştir (Tablo IV). Sitopatolojik değerlendirme sonuçları HSIL, LSIL ve ASC-US olarak tanımlanan örneklerde HPV-DNA pozitiflik oranları sırasıyla %95, %77.8 ve %35.7 olarak bulunmuştur. Sitolojik atipi izlenen ve izlenmeyen örneklerde HPV-DNA pozitifliği sırasıyla %72.6 ve %17.6 oranlarında saptanmıştır. HPV-DNA pozitifliği olan hastalarda HPV-DNA negatif hastalara göre sitolojik atipi görülme riskinin 12.4 kat, HSIL görülme riskinin ise 51.9 kat daha yüksek olduğu izlenmiştir. Tiplendirme yapılamayan sekiz örnekte ise atipi ve HSIL oranları sırasıyla %75 ve %12.5'tir.

Tiplendirme yapılan örneklerde saptanan HR-HPV tip sayısındaki artışla beraber sitolojik atipi ve HSIL görülme oranlarının da artış gösterdiği belirlenmiştir. Sadece LR-HPV

Tablo IV. Çeşitli Servikal Lezyonlarda HPV İzolatlarının Sayısal Dağılımı

	LSIL	HSIL	ASC-US	ASC-H	AGC	Normal sitoloji	Toplam izolat
HPV-DNA pozitif örnek	35	19	9	2	0	44	142
HPV-6	8	2	-	-	-	9	19
HPV-11	5	-	2	-	-	14	20
HPV-16	10	12	-	-	-	10	32
HPV-18	4	1	1	-	-	1	7
HPV-31	1	-	-	-	-	5	7
HPV-33	1	1	-	-	-	2	4
HPV-35	2	4	-	1	-	-	7
HPV-39	-	-	-	1	-	2	3
HPV-45	-	1	-	-	-	1	2
HPV-52	4	2	2	-	-	4	12
HPV-58	3	1	1	-	-	6	11
HPV-68	1	-	-	-	-	5	6
HPV-82	1	2	-	-	-	1	4
Tiplendirilemeyen	4	1	1	-	-	2	8
Toplam izolat sayısı	44	27	7	2	0	62	142
HPV-DNA negatif örnek	10	1	5	2	1	228	0
Toplam örnek sayısı	45	20	14	4	1	272	142

LSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon; HSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon; ASC-US: Önemli bilinmeyen atipik skuamöz hücreler; ASC-H: HSIL'nin dışlanamadığı atipik skuamöz hücreler; AGC: Atipik glandüler hücreler.

tiplerinin saptandığı 27 örnekte sitolojik atipi oranı %40.7 olarak bulunurken, hiçbir HSIL tanısı almamıştır. Tek HR-HPV tipi saptanan 55 örnekte sitolojik atipi ve HSIL görülme oranları sırasıyla %56.4 ve %23.6 olarak ve birden fazla HR-HPV tipi saptanan 19 örnekte atipi ve HSIL görülme oranları sırasıyla %68.4 ve %26.3 olarak bulunmuştur. HPV-DNA pozitif örnekler değerlendirildiğinde; en az bir HR-HPV tipinin saptandığı örneklerde sadece LR-HPV saptananlara göre sitolojik atipi görülme riskinin 2.1 kat arttığı gözlenmiştir.

TARTIŞMA

DNA dizi homolojileri ve filogenetik farklılıklarına göre tanımlanan HPV genotiplerinin sayısı 200'ü aşmış olup 40'tan fazla HPV tipinin anogenital bölgede enfeksiyon etkeni olduğu gösterilmiştir^{2,5}. HPV tipi kanseröz dönüşümde iyi tanımlanmış bir risk faktörü olduğu için, lezyonlarda HPV-DNA varlığının gösterilmesinin yanında etken genotipin belirlenmesi de önem arz etmektedir. Doğru moleküler genotiplendirme ayrıca; çoklu tiplerle oluşan enfeksiyonların saptanması, tekrarlayan örneklerde aynı tipin gösterilmesiyle HPV persistansının doğrulanması, minör lezyonların ve tedavi sonrası durumun takibi ve HPV aşılarının popülasyondaki etkinliğinin öngörülebilmesi açısından da önemli-

dir^{5,14-16}. Toplumsal HPV prevalansının, çoklu enfeksiyonların ve tip dağılımının doğru olarak belirlenebilmesi, büyük ölçüde seçilecek olan testin saptama ve tiplendirme duyarlılığına bağlıdır. Klinik örneklerde HPV-DNA varlığını saptamak için her biri farklı yaklaşım ve uygulamalar içeren çok sayıda tanı yöntemi geliştirilmiştir¹⁴. Ancak, her bir test sisteminin kendine özgü güçlü ve zayıf yönleri bulunmaktadır¹⁷. Klinik örneklerde HPV-DNA varlığı araştırılırken, ilk olarak konsensus primerler ile genel bir tarama yapılması ve pozitif bulunan örneklerde tiplendirme yöntemlerine başvurulması günümüzde yaygın olarak kullanılan bir stratejidir¹⁷. Konsensus primerler (MY09/11, GP5+/6+, PGMY09/11, SPF-10) tek bir PCR'de en fazla sayıda genital HPV tipini amplifiye etmek için tasarlanmıştır¹⁷. Ancak her bir konsensus primer sisteminin kendine özgü sınırlamaları bulunmakta ve farklı HPV tipleri için saptama duyarlılıkları değişebilmektedir^{14,17}. Ülkemizde ve dünyada ters hibridizasyon, *microarray/bead array* ve DNA dizi analizi temelli testlerde de konsensus primerlerin kullanıldığı ve sadece HPV-DNA pozitif örneklerde tiplendirme analizlerinin yapıldığı düşünüldüğünde, prevalans verileri ilk basamakta kullanılan yöntemin saptama duyarlılığına bağımlı olmaktadır. Bu şekilde elde edilen verilere dayanarak yapılan hasta ve toplum bazlı risk analizlerinin öneminin azalacağını ve verilerin epidemiyolojik değerinin sınırlı kalacağını düşünmekteyiz. Bizim düşüncemize göre HPV'lerin tipe özgül olarak taranması ideal olan yaklaşımdır. Ancak, bu şekilde tarama yapabilen mevcut ticari testlerin yüksek maliyetli olması nedeniyle bu testlerin rutin tanı laboratuvarlarında kullanımı, özellikle gelişmekte olan ülkeler için önemli bir sorundur.

HPV-DNA pozitiflik oranları, çoklu enfeksiyon sıklığı ve tip prevalansları çalışma gruplarının özelliklerine ve bölgelere göre de değişmektedir. Örneğin, Clifford ve arkadaşlarının¹⁸ aynı tanı yöntemiyle 11 farklı ülkeden 15.613 normal sitolojili kadında HPV prevalansını araştırdıkları çalışmada, genel olarak en sık HPV-16 saptanırken sıklık sırasına göre saptanan diğer tiplerin HPV-42, HPV-58, HPV-31, HPV-18 ve HPV-56 olduğu, ancak bu sıralamanın bölgelere göre belirgin farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. Bununla beraber, dünya genelinde en sık izole edilen HR-HPV tipi HPV-16 olup, servikal kanserli olguların yaklaşık %50'sinden izole edilmektedir². Servikal kanser olgularının yaklaşık %70'inde ise HPV-16 ve HPV-18'in beraber sorumlu olduğu; geriye kalan olguların neredeyse tamamında diğer HR-HPV tiplerinin saptandığı bildirilmektedir². Servikal kanserliler hariçindeki hasta gruplarında ise HPV-18 daha az sıklıkta izole edilmektedir^{18,19}. Poliklinik hastalarından oluşan çalışma grubumuzda hem sitolojik atipi izlenen hem de sitolojik incelemeleri normal olan hasta gruplarında en sık izole edilen tip HPV-16 olarak saptanmıştır. Fakat HPV-52 ve HPV-58'in HPV-18'den daha sık, HPV-31 ve HPV-35'in ise HPV-18 ile aynı sıklıkta saptanmış olması ve HPV-16/HPV-18 dışındaki tiplerin yüksek riskli HPV'lerin yarısından fazlasını (%58.9) oluşturması dikkate değer bir bulgu olarak değerlendirilebilir.

Ülkemizde son beş yılda HPV genotip tayini yapılan çalışmalarda bir artış olduğu görülmektedir. Bu çalışmalardan örnek sayısı 25'in üzerinde olan ve HPV tiplendirmesi yapılan 11 çalışmaya ait veriler incelendiğinde, benzer hasta gruplarının HPV-DNA pozitiflik oranlarının birbirine yakın olduğu görülmektedir^{9,20-29}. Bu çalışmalarda servikal kanser örneklerinde^{20,21} %92.5-93.5, servikal intraepitelyal lezyonlarda (CIN-1,2,3)^{21,22}

%71.4-73.5, atipik servikal sitolojisi olan kadınlarda^{9,23,24} %44.7-55.2, poliklinik hastalarında²⁵⁻²⁷ %37.9-45.9 ve asemptomatik kadınlarda^{21,28,29} %5.2-6.5 oranlarında HPV-DNA pozitifliği bulunmuştur. Ancak bu çalışmalarda, HPV tip dağılımında benzer bir uyum görülmediğinden ülkemizdeki tip prevalansının belirlenmesine katkıda bulunacak bir veri elde edilememiştir. Tip dağılımlarındaki uyumsuzluğun en önemli nedenlerinin söz konusu çalışmaların her birinde farklı tanı yöntemlerinin kullanılması ve çalışmaların genel olarak sınırlı sayıdaki hasta gruplarında yapılması olduğunu düşünmekteyiz. Bu yüzden ülkemizdeki HPV tip prevalansını tam olarak kestirmek mümkün gözükmemektedir. Ancak bu çalışmalara ait verilere göre HPV-16'nın en sık saptanan yüksek riskli tip olduğu, diğer tiplerin ise farklı sıklıklarda saptandığı söylenebilir. Bu yüzden ülkemiz özelinde gerçek HPV tip prevalansının belirlenebilmesi ve HPV aşısı politikalarının maliyet-etkinliğinin analiz edilebilmesi için standart bir yöntemin kullanıldığı, gerekirse çok merkezli ve kurumsal destekli olmak üzere geniş kapsamlı olarak planlanacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Ülkemizde bu amaçla planlanmış olan proje henüz devam etmektedir³⁰.

HPV tanı testlerinin çoklu enfeksiyonları saptayabilme özelliklerindeki sınırlılıklar nedeniyle yapılan ilk çalışmalarda bu tip enfeksiyonlar nadiren saptanabilmiştir. Örneğin; dünyada yaygın kullanılan bir yöntem olan Hybrid Capture 2 (Digene, ABD)'nin HPV'leri genotip düzeyinde tanımlayamamasının yanı sıra çoklu enfeksiyonların saptanmasındaki etkinliği de sınırlı olmuştur. Benzer şekilde, sinyal amplifikasyon testleri genel olarak düşük kopya sayılı tipleri saptayamamış ve ilk geliştirilen PCR testleri sınırlı sayıda HPV tipini tarayabilmiştir^{31,32}. Ancak, son 10 yılda HPV tanı testlerindeki gelişmelere paralel olarak yapılan yeni çalışmalarla çoklu enfeksiyon sıklığının, özellikle genç kadınlarda tahmin edilenden daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. Örneğin; Chaturvedi ve arkadaşları³³, HPV-DNA pozitif 2478 genç kadında çoklu enfeksiyon oranını %43.2 olarak bulmuşlar ve örneklerin 55 (%6.8)'inde beş veya daha fazla HPV tipinin eş zamanlı enfeksiyon etkeni olduğunu göstermişlerdir. Çoklu enfeksiyonların sıklığı bölgelere göre de değişmektedir. Clifford ve arkadaşlarının¹⁸ aynı tanı yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada, 13 farklı bölgede çoklu enfeksiyon sıklığı %11.5 ile %42.4 oranları arasında değişiklik göstermiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalardan HPV-DNA pozitif örnek sayısı ≥ 25 olan ve tiplendirme yapılan dört çalışmada çoklu enfeksiyon oranları %2.1-39 arasında değişmekte olup, çok sayıda HPV tipini tarayan multipleks yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda bu oranların daha yüksek olduğu görülmüştür^{21,23,26,27}. Bu farklılıkların muhtemel sebepleri, bölgesel farklılıktan ziyade kullanılan tanı yöntemlerinin ve yaklaşımlarının farklı olması ve çalışmaların değişik hasta gruplarından oluşan küçük örneklemelerde yapılmasıdır. Bizim çalışmamızda çoklu enfeksiyon sıklığı %28.7 olarak bulunmuş ve en fazla üç farklı HPV tipinin eş zamanlı enfeksiyon etkeni olduğu saptanmıştır. Konsensus PCR ile pozitif olarak değerlendirilen sekiz örnekte ise tiplendirme yapılamamıştır. Bu veriler, çalışmamızda tespit edilen çoklu enfeksiyon oranının, taranan tip spektrumunun genişletilmesiyle daha yüksek oranlarda saptanacağını göstermektedir. Ayrıca, ülkemizde yapılan diğer araştırmalarda oranları değişmek üzere çalışmamız kapsamına dahil etmediğimiz farklı tiplerin saptandığı görülmektedir. Örneğin bu çalışmaların birinde çalışmamızda yer almayan tiplerden HPV-51 ve HPV-56, HPV-16'dan sonra en sık saptanan tipler ol-

muştur²⁷. Çalışmamızda tiplendirme yapılamayan sekiz örnekte atipi ve HSIL görülme oranlarının yüksek olması nedeniyle (sırasıyla %75 ve %12.5) bu tiplerin HR-HPV olma olasılıkları daha yüksek gözükmemektedir. Tüm bu veriler çalışmamızda araştırdığımız mevcut tip spektrumunun genişletilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu noktaları dikkate alarak, rutin analizlerde kullandığımız tipe özgül PCR yönteminin tarayabildiği tip spektrumunu özellikle tüm yüksek riskli HPV tiplerini kapsayacak şekilde genişletmekteyiz.

Bunlara ek olarak çoklu enfeksiyonlarda HPV tiplerinin birbirleriyle olan biyolojik etkileşimleri ve bunun kanseröz dönüşüm üzerine olan etkileri tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamız sayısal olarak küçük bir grubu içermekte ise de, eş zamanlı enfeksiyon etkini olan HR-HPV tip sayısı arttıkça sitopatolojik atipi görülme oranının arttığı ve çoklu enfeksiyonlarda sitolojik atipi ve HSIL görülme risklerinin yükseldiği bulunmuştur.

Yeni geliştirilen HPV aşılı özellikle yüksek riskli tiplerden HPV-16 ve HPV-18'e karşı etkilidir. Son zamanlarda yapılan ve yeni nesil testlerin kullanıldığı genotip bazlı prevalans çalışmalarının bazılarında HPV-18 dünya geneline göre daha az sıklıkta saptanmıştır^{34,35}. Her ne kadar çalışma grubumuz küçük ve kullandığımız yöntemin tip spektrumu tüm HR-HPV tiplerini kapsamıyor olsa da, HPV-16 ve HPV-18 dışındaki HR-HPV tiplerinin yüksek oranda olması nedeniyle; daha fazla HPV tipi için özgün tanımlama yapabilen tipe özgül PCR temelli testlerin veya mikroçip tekniklerinin kullanıldığı çalışmaların artması ile tip dağılımı ve prevalans verilerinin önemli ölçüde değişebileceğini ve bu durumun mevcut aşılardan öngörülen etkinliğini önemli ölçüde etkileyebileceğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak bu çalışmada, sadece konsensus primerler ile HPV-DNA varlığını araştırmanın HPV enfeksiyonlarının tanı, tedavi ve takip basamaklarını yönetmede yetersiz bir yaklaşım olduğuna dikkat çekilmesi amaçlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Leto MD, Santos GF Jr, Porro AM, Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol* 2011; 86(2): 306-17.
2. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5(1): 24-31.
3. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006; 24(Suppl 1): S1-15.
4. de Sanjosé S, Díaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(7): 453-9.
5. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32(Suppl 1): S16-24.
6. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338(7): 423-8.
7. Özgül N. Türkiye'de serviks kanserinin durumu ve servikal kanser tarama çalışmaları, s: 349-58. Tuncer AM (ed), Türkiye'de Kanser Kontrolü. 2007, T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Yayın No: 707. Onur Matbaacılık, Ankara.
8. Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 2008; 107(3): 198-217.

9. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Fırat P, et al. Sitolojik atipi izlenen servikal örneklerde insan papilloma virusunun polimeraz zincir reaksiyonu ve hibridizasyon yöntemleriyle saptanması ve tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(2): 273-82.
10. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287(16): 2114-9.
11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds). Appendices B16. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 1989, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
12. Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital HPV infection using consensus PCR, pp: 131-52. In: Herrington CS, McGee JO'D (eds), *Diagnostic Molecular Pathology: A Practical Approach*. 1992, Oxford University Press, UK.
13. Yapar M, Aydoğan H, Pahsa A, et al. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58(6): 358-62.
14. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32(Suppl 1): S43-51.
15. Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecol Oncol* 2005; 99 (3 Suppl 1): S7-11.
16. Hwang HS, Park M, Lee SY, Kwon KH, Pang MG. Distribution and prevalence of human papillomavirus genotypes in routine pap smear of 2,470 Korean women determined by DNA chip. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(12): 2153-6.
17. Gravitt PE, Viscidi RP. Measurement of exposure to human papillomaviruses, pp: 119-41. In: Rohan TE, Shah KV (eds), *Cervical Cancer: From Etiology to Prevention (Cancer Prevention-Cancer Causes)*. 2004, Kluwer Academic Publishers, Boston.
18. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; 366(9490): 991-8.
19. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24(Suppl 3): S3/26-34.
20. Usubütün A, Alemany L, Küçükali T, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer specimens from Turkey. *Int J Gynecol Pathol* 2009; 28(6): 541-8.
21. Yıldırım D. Bölgemizde servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda onkojenik human papillomavirus genotiplerinin prevalansının belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
22. Yavuzer D, Karadayı N, Erdağı A, Salepci T, Baloglu H, Dabak R. Serviks kanseri ve prekanseröz lezyonlarında PCR ile HPV tipleme. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi* 2009; 20(1): 1-6.
23. Köksal MO. Jinekoloji kliniğine başvuran hastalarda human papillomavirus sıklığının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2007.
24. Uzun Çilingir I. Servikal kanser tarama programında sitolojik patoloji saptanan hastalarda HPV DNA tayini ve tiplemesinin kolposkopik ve histopatolojik sonuçlarla ve sitoloji tekrarıyla karşılaştırmalı analizi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2008.
25. Eren H. Serviks prekanseröz lezyonlarındaki human papilloma virus prevalansı. T.C. Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2007.
26. Batmaz G, Çetin A, Dane C, Görgen H, Dane B. Normal ve anormal servikal smear saptanan kadınlarda HPV DNA pozitifliği. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi* 2009; 1(1): 10-14.
27. Nalça Erdin B, Duran A, Sayiner AA. Servikal sürüntü ve biyopsi örneklerinde saptanan HPV tipleri. 4. Ulusal Viroloji Kongresi, 23-26 Haziran 2011, İstanbul. Kongre Kitabı, CYBH-005, s: 173-4.
28. Altun Z. Çukurova bölgesindeki kadınlarda genital human papillomavirus enfeksiyon prevalansı. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2009.

29. Alkış Koçtürk S. Menopoz öncesi ve sonrası kadınlarda insan papilloma virüs (HPV) DNA'sının araştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2010.
30. Tuncer M. T.C. Ulusal Kanser Programı 2009-2015. 2009, Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Yayın No: 760. Ankara.
31. Handricks DA, Comanor L. Signal amplification-based techniques, pp: 19-64. In: Lorincz A (ed), Nucleic Acid Testing for Human Disease. 2006, CRC/Taylor & Francis, New York.
32. Plummer M, Vaccarella S, Franceschi S. Multiple human papillomavirus infections: the exception or the rule? J Infect Dis 2011; 203(7): 891-3.
33. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, et al; CVT Group. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. J Infect Dis 2011; 203(7): 910-20.
34. Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, Kosz-Vnenchak M. Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears. Acta Biochim Pol 2008; 55(4): 687-92.
35. Lee JH, Lee NW, Hong SW, Nam YS, Choi JW, Kim YS. Establishment of an efficient multiplex real-time PCR assay for human papillomavirus genotyping in cervical cytology specimens: comparison with hybrid capture II. Cytopathology 2011; 22(4): 261-8.