

Eskişehir’de Kadınlarda İnsan Papillomavirus Prevalansının, Pap Yayması, Hibrid Yakalama 2 Testi ve Konsensus Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması ve Pirodizileme Yöntemiyle Tiplendirilmesi*

Investigation of Human Papillomavirus Prevalence in Women in Eskişehir, Turkey by Pap Smear, Hybrid Capture 2 Test and Consensus Real-Time Polymerase Chain Reaction and Typing with Pyrosequencing Method

Ferhat Gürkan ASLAN¹, Tercan US², Nilgün KAŞİFOĞLU², Sabit Sinan ÖZALP³, Yurdanur AKGÜN², Tufan ÖGE³

¹ Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya.

¹ Sakarya University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Sakarya, Turkey.

² Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

² Osmangazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Eskişehir, Turkey.

³ Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Eskişehir.

³ Osmangazi University Faculty of Medicine, Department of Gynecology and Obstetrics, Eskişehir, Turkey.

* Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 201111011 no’lu proje olarak desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 02.08.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.10.2015

ÖZ

İnsan papillomavirus (HPV) enfeksiyonları, subklinik veya asemptomatik enfeksiyonlardan anogenital kanserlere kadar değişen geniş bir klinik spektruma sahiptir. Önlenabilir bir hastalık olarak düşünülen servikal kanser (SK), dünyada, kadınlarda üçüncü en sık görülen kanser türü olduğundan, SK taramalarında HPV-DNA’sının saptanması ve risk grubunun belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, Eskişehir’de, kadınlarda HPV-DNA varlığının iki farklı moleküler yöntemle araştırılarak, moleküler yöntem sonuçlarının hem birbirleriyle hem de sitoloji sonuçlarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır. Araştırmaya, Eskişehir Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi’ne (KETEM) tarama amaçlı başvuran, 30-65 yaş arası 1081 kadın dahil edilmiştir. Katılımcılardan Pap yayması ve moleküler yöntemler için, eş zamanlı

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Ferhat Gürkan Aslan, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Korucuk Kampüsü, Sakarya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 264 295 6630, **E-posta (E-mail):** ferhatgurkan33@hotmail.com

üç ayrı servikal sürüntü örneği alınmıştır. Araştırmanın ilk aşamasında, tüm servikal örneklerde HPV-DNA varlığı Hybrid Capture 2 (HC2; Qiagen, Almanya) yöntemiyle araştırılmış; ikinci aşamada ise HPV-DNA’sı pozitif bulunan kadınların dahil edildiği, geri kalanının ise rastgele seçildiği toplam 152 kadının örnekleri konsensus gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile tekrar çalışılmış (Takara Bio Inc., Japonya) ve HPV-DNA varlığı saptanan örneklerde pirodizilemeye dayalı ticari sistem (Diatech Pharmacogenetics S.R.L, İtalya) ile genotip tayini yapılmıştır. Çalışmanın ilk basamağında; kadınların %3 (32/1081)’ünde HC2 testi, 47 (%4.4)’sinde ise sitoloji sonucu tek başına ve/veya birlikte pozitif olarak raporlanmıştır. Beş (%0.5) örnekte her iki test ile de pozitif sonuç alınmış, bunların dördünde yüksek riskli HPV-DNA saptanmıştır. HC2 testi ile yüksek riskli HPV varlığı saptanan 23 (23/1081, %2.1) kadının 19’unda sitoloji sonuçları negatif olarak raporlanmıştır. Sitoloji sonucu pozitif olarak saptanan 42 (42/1081, %3.9) örnekte ise HC2 testi ile HPV-DNA varlığı saptanmamıştır. Çalışmanın ikinci aşamasına dahil edilen 152 örnekten 32 (%21.1)’si HC2 testi ile, 40 (%26.3)’ü Pap yayması ile, 53 (%34.9)’ü de konsensus RT-PCR ile tek başına ve/veya birlikte pozitif bulunmuştur. HC2 testi ile pozitif saptanan 32 örneğin tamamı konsensus RT-PCR ile de pozitif olarak saptanmış; ancak RT-PCR ile pozitif saptanan 21 örnek HC2 testi ile negatif sonuç vermiştir. Sitolojisinde anomali saptanan 40 örneğin ise dokuzunda (%22.5) RT-PCR ile ve beşinde (%12.5) HC2 ile HPV-DNA varlığı gösterilirken 31 (%77.5) örnekte her iki yöntemle de HPV-DNA saptanmamıştır. Genotip tayini yapılabilen 44 örnekte en sık saptanan tip, HPV tip 16 (n=15, %34.1) olmuş, bunu tip 90 (n=11, %25) ve tip 18 (n=4, %9.1) izlemiştir. Çalışmamızda, FDA (U.S. Food and Drug Administration) onaylı HC2 testi esas alındığında, Pap yaymasının duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri, sırasıyla %16.1, %96, %10.6 ve %97.5 olarak saptanmıştır. HC2 ve konsensus RT-PCR yöntemleri arasında ise önemli derecede uyumluluk (Cohen’s kappa: 0.665) bulunmuştur. Sonuç olarak, ülkemizdeki sitopatolog sayısının yetersizliği ile birlikte, ASCCP (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology) ve FDA’nın da önerileri göz önüne alındığında; SK taramasının tam ve etkin şekilde yapılabilmesi için, Pap testine ilave olarak moleküler tanı yöntemlerinin uygulanmasına ihtiyaç olduğu bir kez daha ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: İnsan papillomavirusu; prevalans; HPV DNA; tarama; pirodizileme; Eskişehir.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) infections have a broad range of clinical spectrum from subclinical or asymptomatic infection to anogenital carcinoma. The detection of HPV-DNA and determination of the risk groups in cervical cancer (CC) screening is very important because CC is considered to be a preventable illness which is the third most common cancer type of women in the world. The aims of this study were to investigate the presence of HPV-DNA in women by two different molecular methods and to compare their results together with the results of cytology, in Eskişehir, Central Anatolia, Turkey. A total of 1081 women aged between 30-65 years, who applied to Eskişehir Early Diagnosis, Screening and Training of Cancer Center (KETEM) for screening were included in the study. Three separate cervical samples were collected simultaneously from the participants for cytologic examination and molecular studies. In the first step of the study, all cervical samples were investigated for the presence of HPV-DNA by Hybrid Capture 2 (HC2; Qiagen, Germany) method. In the second part of the study, consensus real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) (Takara Bio Inc., Japan) was performed in 152 samples which included HC2 positive and randomly selected negative samples, and then the HPV genotypes were detected by using a commercial kit based on pyrosequencing method (Diatech Pharmacogenetics S.R.L, Italy). In the first part of the study, HC2 test was found positive in 3% (32/1081) of the women, while in 4.4% (47/1081) Pap smear was positive alone or with HC2 test. Five (0.5%) samples yielded positive results with both of the methods, and four of them were positive for high risk HPV types. Cytology results were negative in 19 out of 23 (23/1081, 2.1%) samples that were reported as high risk HPV by HC2 test. On the other hand, 42 (42/1081, 3.9%) samples that were positive by cytology yielded negative results by HC2 test. In the second part of the study, 32 (21.1%) of 152 selected samples were positive by HC2 test, 40 (26.3%) were positive by Pap smear, and 53 (34.9%) were positive by consensus RT-PCR. All of the 32 samples

that were positive by HC2 were also positive by RT-PCR, however 21 samples that were positive by RT-PCR were negative by HC2 test. Among 40 samples that were positive (abnormal) by Pap smear, HPV-DNA was positive in nine (22.5%) by RT-PCR and in five (12.5%) by HC2 test, but HPV-DNA was not detected in 31 (77.5%) samples by both of the tests. Genotyping of the strains could be performed in 44 samples, and the most common type detected was HPV type 16 (n=15, 34.1%), followed by type 90 (n=11, 25%) and type 18 (n= 4, 9.1%). In our study, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of Pap smear method were estimated as 16.1%, 96%, 10.6% and 97.5%, respectively, based on the HC2 results which was approved by U.S. Food and Drug Administration (FDA). In addition, a significant degree of concordance was detected between HC2 and consensus RT-PCR methods (Cohen's kappa: 0.665). In conclusion, regarding the insufficient number of cytopathologists in our country and according to the recommendations of American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) and FDA, it was once again demonstrated that, the implementation of molecular diagnostic methods in addition to the Pap smear for effective screening of CC are needed.

Keywords: Human papillomavirus; prevalence; HPV DNA, screening; pyrosequencing; Turkey.

GİRİŞ

İnsan papillomavirus (Human papillomavirus; HPV) enfeksiyonu, en sık görülen cinsel temasla bulaşan hastalıklardan biridir¹. Dünya genelinde birçok kadın yaşamlarının herhangi bir döneminde HPV ile enfekte olmakta ve yaşam boyu enfeksiyon riski %50-80 arasında değişmektedir. Coğrafi prevalans farklılıkları olmakla birlikte, normal servikal sitolojili kadınların %10.2'sinde HPV-DNA pozitifdir². Hastalık, subklinik veya asemptomatik enfeksiyonlardan anogenital kanserlere kadar değişen geniş bir klinik spektruma sahiptir¹. Günümüzde HPV enfeksiyonunun, invazif servikal kanserin temel etiyolojik faktörü olduğu bilinmekte, servikal kanserlerin %99.7'sinde, servikal kanser prekürsör lezyonlarının ise %95'inde yüksek riskli HPV-DNA varlığı saptanmaktadır^{3,4}. Dünya genelinde, kadınlar arasında üçüncü en yaygın görülen kanser türü olan servikal kanser (SK), az gelişmiş ülkelerde genç kadın (15-44 yaş arası) ölümlerinin en önemli nedenidir. Geçmiş yıllarda, birçok gelişmiş ülkede tarama programlarının uygulanmaya başlanmasıyla SK insidans ve mortalitesi başarılı şekilde düşürülmüştür. Ancak tarama programı olmayan veya eksik uygulanan ülkelerde, yüksek SK insidansı devam etmekte, hatta artma eğilimi göstermektedir. Her gün %85'i az gelişmiş ülkelere olmak üzere tahminen 750 kadın SK nedeniyle ölmektedir^{3,5}.

Şimdiye kadar 200'den fazla farklı tipi tanımlanan HPV'nin yaklaşık 40 tipi insan anogenital sistemini enfekte eder³. Genital enfeksiyonlara neden olan HPV tipleri onkogenik potansiyellerine göre; düşük riskli, muhtemel yüksek riskli ve yüksek riskli tipler olarak gruplandırılmaktadır⁶. Önlenabilir hastalık olduğu gösterilmiş olan SK taramalarında, yüksek riskli HPV tiplerini belirleyen testlerin, primer tarama testi olarak veya anormal sitoloji sonucu takibinde yardımcı test olarak kullanılması, SK veya öncü lezyonları için daha kesin risk değerlendirmesi yaparak, hastaların daha doğru yönlendirilmesini sağlar. HPV-DNA testinin, duyarlılık ve pozitif prediktif değeri açısından sitolojiden üstün olduğu gösterilmiştir ve gelişmiş ülkelerde, SK taramasında önemli bir yöntem haline gelmiştir^{1,4,7}.

Günümüzde Amerikan Kanser Derneği (ACS) ile Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneği (ASCCP), 30 yaş ve üzeri kadınlarda SK taramalarında sitoloji ile birlikte HPV-DNA testini de önermekte ve en önemli FDA (Food and Drug Administration), ASCUS’lu kadınların yönlendirilmesinde veya 30 yaş ve üstü kadınlarda sitolojiyle birlikte HPV-DNA testinin de kullanımını onaylamaktadır. HPV-DNA varlığının saptanmasında kullanılmak üzere beş moleküler test FDA tarafından kabul edilmiştir. Bunlar sırasıyla; Digene Hybrid Capture 2 high-risk HPV DNA test QIAGEN (Germantown, MD), Cervista HPV HR Hologic (Bedford, MA), Cervista HPV 16/18 Hologic (Bedford, MA), Cobas HPV test Roche Molecular Systems (Pleasanton, CA) ve APTIMA HPV assay Gen-Probe (San Diego, CA) testleridir^{8,9}. Bu çalışmada, Eskişehir’de, 30-65 yaş arası kadınlarda HPV-DNA varlığı iki farklı moleküler yöntemle araştırılarak, moleküler yöntem sonuçları hem birbirleriyle hem de Pap yayması (smear) test sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Etik Kurulu’nun onayı (31.05.2011 tarih ve 08 sayılı karar) alınarak başlanılan araştırmaya, Eskişehir Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi (KETEM)’ne tarama amaçlı başvuran, 30-65 yaş arası 1081 kadın dahil edildi. İşlem öncesi tüm katılımcıların, sözlü ve yazılı olarak aydınlatılmış onamları alındı.

Araştırma grubundaki kadınlardan, sitolojik inceleme ve moleküler yöntem çalışmaları için, servikal örnekleme fırçası kullanılarak, üreticinin talimatları doğrultusunda, eş zamanlı üç ayrı servikal sürüntü örneği alındı. Örneklerin tamamının, sitolojik işlemleri ve değerlendirmesi, Eskişehir KETEM’de görevli patoloji uzmanları tarafından Bethesda 2001 sistemine göre gerçekleştirildi. Sitoloji sonuçları; 1) Normal bulgular (intraepitelial lezyon veya malignensi yönünden negatif), 2) ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance), 3) AGUS (Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance), 4) LGSIL (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion), 5) HGSIL (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion) ve 6) Bilgilendirici olmayan/yetersiz materyal şeklinde sınıflandırıldı¹⁰.

Moleküler çalışmalar ise ESOĞÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında iki farklı yöntemle yapıldı. İlk olarak tüm servikal örneklerde; 13 yüksek riskli (tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve 5 düşük riskli (tip 6, 11, 42, 43, 44) HPV tipini belirleyebilen, Hybrid Capture 2 kiti (HC2; Qiagen, Almanya) kullanılarak, üreticinin talimatları doğrultusunda, HPV-DNA varlığı araştırıldı. Bir sinyal amplifikasyon yöntemi olan ve semikantitatif sonuç veren bu yöntem, HPV-DNA varlığını gösteren, ancak HPV genotipini belirlemeyen ve SK’in saptanmasındaki klinik yararından dolayı en yaygın kullanılan moleküler yöntemdir. Rölatif ışık ünitesi (RLU) değeri, sınır değerine (sınır değer: 1.0 RLU= 1 pg HPV-DNA= 5000 genom) eşit veya yüksek olan örnekler, HPV-DNA yüksek riskli ya da düşük riskli olarak belirlendi^{4,11,12}.

Çalışmanın ikinci kısmında ise, HC2 testi ile HPV varlığı saptanan örnekler (n= 32) ile birlikte rastlantısal olarak seçilen (n= 120) toplam 152 servikal sürüntü örneğinde, TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Custom kiti (Takara Bio Inc., Japonya) ve GP5+/GP6+ primerleri

kullanılarak HPV konsensus gerçek zamanlı (real-time) PCR (RT-PCR) çalışıldı. Bu yöntemle HPV-DNA saptanan örneklerde, HPV Sign Kit (Diatech Pharmacogenetics S.R.L, İtalya) kullanılarak pirodizilemeye dayalı ticari sistem ile genotip tayini yapıldı. Bu yöntem, beta-globulin geni ve HPV L1'in çok değişken bir bölgesini hedefleyen karışık primerlerle, Rotor-Gene Q'da bir RT-PCR (EVA Green™ kimyasal) kullanılarak HPV-DNA'nın geniş bir grubunun çoğaltılması sonrasında çoklu dizileme primerleri ile pirodizileme temeline dayanır. HPV-DNA varlığı erime eğrisi analizi ile semikantitatif olarak belirlendi. Sadece HPV pozitif örnekler, viral genotiplerin belirlenmesi için dört özgül dizileme primerlerinin kullanıldığı, pirodizilemeye dayalı ticari sistem olan Pyromark Q24 system (QIAGEN) ile analiz edildi¹²⁻¹⁴.

Testlerin istatistiksel veri analizleri SPSS 20.0 paket programları ile yapıldı ve moleküler yöntem sonuçlarının birbirleriyle uyumluluk derecesi Cohen's kappa (κ) katsayısına göre değerlendirildi.

BULGULAR

Araştırmaya katılan 1081 kadının, 74 (%6.8)'ünde Pap yayması ve/veya HC2 testlerinden en az birinde sitoloji anormallliği veya HPV-DNA pozitifliği saptanmıştır. HC2 testi 32 (%3) kadında pozitif bulunmuş; Pap yayması sonucu, 47 (%4.3) kadında patolojik, 5 (%0.5) kadında ise değerlendirme için yetersiz olarak raporlanmıştır. Buna karşın, HC2 testi negatif iken Pap yaymasında anormallik saptanan 42 (%3.9); HC2 testi pozitif iken Pap yayması normal olanların sayısı ise 26 (%2.4) olarak belirlenmiştir.

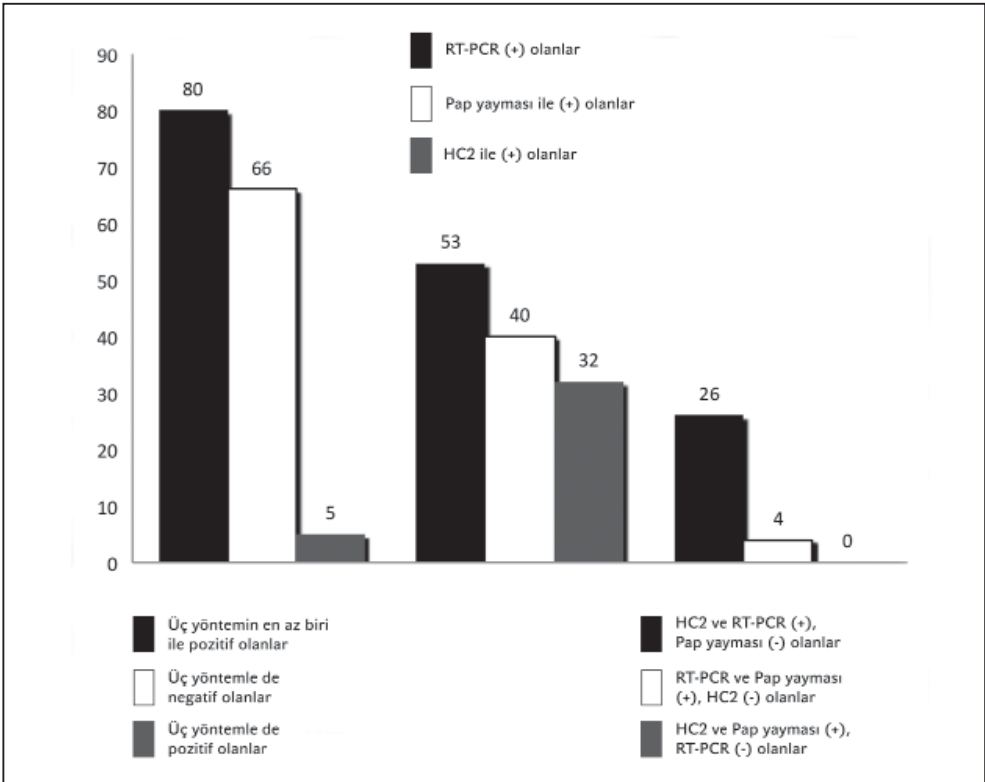
HC2 testi ile HPV-DNA varlığı saptanan 32 kadının 22 (%68.8)'inde yüksek riskli, 9 (%28.1)'unda düşük riskli ve 1 (%3.1)'inde hem yüksek hem de düşük riskli HPV tiplerinin varlığı gösterilmiştir. Pap yayması ile HC2 testinin sonuçları karşılaştırıldığında; sitolojisi normal olanların 19 (%1.8)'unda, ASCUS olanların 3 (%7.5)'ünde ve HGSIL olanların 1 (%33.3)'inde yüksek riskli HPV varlığı saptanmıştır. Buna karşın Pap yayması ASCUS olarak raporlanan 40 örneğin 36 (%90)'sında, AGUS olarak raporlanan 3 (%100) örneğin hiçbirinde, HGSIL olarak raporlanan 3 örneğin 2 (%66.7)'sinde, LGSIL olarak raporlanan bir örnekte ve yetersiz yayma olarak raporlanan 5 örneğin hiçbirinde HC2 testi ile yüksek riskli HPV varlığı tespit edilmemiştir (Tablo I).

Tablo I. Pap Yayması ve Hibrid Yakalama (HC2) Test Sonuçlarının Karşılaştırılması (n= 1081)

Pap yayması sonuçları (n)	HC2 Sonuçları (n)				Toplam
	Negatif	Yüksek riskli HPV	Düşük riskli HPV	Yüksek + düşük riskli HPV	
Normal	1003	18	7	1	1029
ASCUS	36	3	1	0	40
AGUS	3	0	0	0	3
LGSIL	1	0	0	0	1
HGSIL	2	1	0	0	3
Yetersiz yayma	4	0	1	0	5
Toplam	1049	22	9	1	1081

Çalışmanın ikinci aşamasında, HC2 testi ile HPV-DNA’sı saptanan 32 ve rastlantısal olarak seçilen 120 örnek (bunların 40’ı Pap yaymasında anomalisi olan örnektir) olmak üzere toplam 152 servikal sürüntü örneğinin 53 (%34.9)’ünde konsensus RT-PCR ile HPV-DNA varlığı saptanmıştır. Dolayısıyla örneklerin %52.6 (80/152)’sında, RT-PCR, HC2 ve/veya Pap yayması testlerinden en az biri pozitifdir. Her üç yöntemle de pozitif saptanan örnek sayısı 5 (%3.3), her üç yöntemle de negatif saptanan örnek sayısı ise 66 (%43.4)’dir.

İkinci aşamada test edilen örneklerin %17.1 (26/152)’inde HC2 ve RT-PCR pozitif iken Pap yayması negatif; %2.6 (4/152)’sında Pap yayması ve RT-PCR pozitif iken HC2 negatif olarak saptanmış; Pap yayması ve HC2 pozitifken RT-PCR’ın negatif olduğu hiçbir örnek bulunamamıştır. Buna göre yöntemler arasındaki uyumun karşılaştırılmasında $\kappa = 0.665$ (önemli düzeyde) olarak hesaplanmıştır. Bu grupta, Pap yayması yetersiz olduğu için değerlendirilemeyen 3 (3/152, %2) örnekten 1’i HC2 testi ile düşük riskli HPV olarak saptanmış ve pirodizileme sonucu tip 11 HPV olarak tanımlanmıştır. Diğer 2 kadının HC2 ve RT-PCR sonucu ise negatif olarak belirlenmiştir. Sadece RT-PCR ile pozitif olanların sayısı 17 (%11.2), sadece Pap yayması ile anormali (pozitif) saptananların sayısı 31 (%20.4) iken sadece HC2 ile pozitif olan örnek yoktur (Şekil 1).



Şekil 1. Araştırma grubunda (n= 152) yöntemlere göre pozitiflik ve negatiflik sayıları.

HC2 testi ile pozitif saptanan 32 örneğin tamamı konsensus RT-PCR ile de pozitif olarak saptanmış; ancak 2 (%6.2)'si pirodizilemeye dayalı ticari sistem ile tiplendirilememiştir. Diğer taraftan RT-PCR ile pozitif saptanan 21 örnek HC2 testi ile negatif saptanmış, pirodizileme sistemiyle bunların 14 (%66.7)'ü tiplendirilmiş, 7 (%33.3)'sinde tip belirlenememiştir (Tablo II).

Pirodizilemeye dayalı ticari sistem ile yapılan genotip tayininde; örneklerin 20 (%45.5)'sinde yüksek riskli HPV, 12 (%27.3)'sinde muhtemel yüksek riskli HPV, 8 (%18.2)'inde düşük riskli HPV, 4 (%9.1)'ünde ise birden fazla HPV tipi saptanmıştır. Birden fazla tipin saptandığı 4 örneğin 3'ünde tiplerden en az biri yüksek riskli olarak belirlenmiştir (Tablo II).

Pirodizilemeye dayalı ticari sistemde yüksek riskli olarak belirlenen 18 örneğin 16 (%88.9)'sı HC2 testinde de yüksek riskli grupta saptanırken; 1 (%5.6) örnek düşük riskli grupta, 1 (%5.6) örnek de hem yüksek hem düşük riskli grupta saptanmıştır. Pirodizilemede muhtemel yüksek riskli grupta saptanan 12 örnekten 7 (%58.3)'si HC2 testinde negatif olarak saptanırken, 3 (%25) örneğin düşük risk, 2 (%16.7) örneğin ise yüksek risk grubunda olduğu belirlenmiştir (Tablo II).

HC2 yöntemi sonuçları ile pirodizilemeye dayalı ticari sistemde saptanan tip dağılımlarının karşılaştırması Tablo III'te görülmektedir. RT-PCR ile pozitif saptanıp pirodizilemeye dayalı ticari sistem ile tiplendirilebilen 44 örneğin 12 (%27.3)'sinde tip 16 tek başına saptanırken, 3 (%6.8) örnekte bir başka tiple beraber (tip 16+tip33, tip 16+tip70 ve tip16+tip90) saptanmıştır. Tip 16, pirodizilemede en çok karşılaşılan tip (15/44, %34.1) olmuş; bunu tip 90 (11/44, %25) ve tip 18 (4/44, %9.1) izlemiştir.

Araştırmanın ikinci kısmında; sitolojisinde anomali saptanan 40 örneğin 9 (%22.5)'unda konsensus RT-PCR ile ve 5 (%12.5)'inde HC2 ile HPV-DNA varlığı gösterilmiş, 31 (%77.5)'inde her iki yöntemle de HPV-DNA saptanmamıştır. Pozitif saptanan 9 örneğin ise pirodizilemeye dayalı ticari sistem ile 3 (%33.3)'ü tip 16, 2 (%22.2)'si tip 51, 1 (%11.1)'i tip 66, 1 (%11.1)'i tip 90, 1 (%11.1)'i tip 6, 1 (%11.1)'i ise tip 16 ve tip 33 olarak tiplendirilmiştir (Tablo IV).

Tablo II. Konsensus RT-PCR ve/veya HC2 Testi ile Pozitif Saptanan Örneklerde HPV Tiplerinin Dağılımı (n= 53)

HC2 testi	Konsensus RT-PCR + Pirodizileme					Toplam
	Yüksek riskli tip	Muhtemel yüksek riskli tip	Birden fazla tip	Düşük riskli tip	Tiplendirilemeyen	
Yüksek riskli tip	16	2	3	0	1	22
Düşük riskli tip	1	3	0	4	1	9
Yüksek/Düşük riskli tipler	1	0	0	0	0	1
Negatif	2	7	1	4	7	21
Toplam	20	12	4	8	9	53

HC2: Hibrid yakalama 2 testi; RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

Tablo III. Konsensus RT-PCR ve/veya HC2 Yöntemi ile Pozitif Saptanan Örneklerin, Pirodizilemeye Dayalı Ticari Sistem ile Belirlenen Genotip Dağılımı

Genotip dağılımı	Konsensus RT-PCR pozitif (n= 53)	
	HC2 Negatif (n= 21)	HC2 pozitif (n= 32)
Yüksek riskli genotipler		
16 (n= 12)	1	11
18 (n= 4)	0	4
51 (n= 2)	1	1
56 (n= 1)	0	1
58 (n= 1)	0	1
Çoklu genotipler		
16, 33 (n= 1)	0	1
16, 70 (n= 1)	0	1
16, 90 (n= 1)	0	1
70, 90 (n= 1)	1	0
Muhtemel yüksek riskli genotipler		
66 (n= 3)	3	0
90 (n= 9)	4	5
Düşük riskli genotipler		
6 (n= 2)	0	2
11 (n= 1)	0	1
34 (n= 2)	2	0
42 (n= 1)	0	1
70 (n= 2)	2	0
Tiplendirilemeyen (n= 9)	7	2
HPV-DNA negatif (n= 99)	99	0

HC2: Hibrid yakalama 2 testi; RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

Pirodizilemeye dayalı ticari sistemde yüksek riskli tip içeren 23 örnekten 17’si (%73.9) Pap yaymasında, farklı 2’si (%8.7) ise HC2 testinde negatif olarak saptanmıştır. HC2 testi ile negatif olarak belirlenen bu iki örnekten birinin Pap test sonucu LGSİL olarak, diğeri- nin sonucu ise HGSİL olarak rapor edilmiştir. Pap testi sonucu HGSİL olarak raporlanan bir örnekte ise, hem RT-PCR hem de HC2 testinde HPV varlığı gösterilememiştir.

TARTIŞMA

Dünyanın birçok yerinde, farklı yöntemler kullanılarak, farklı popülasyonlarda, HPV prevalansını belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bizim araştırma grubumuzu oluşturan 1081 kadında, HC2 yöntemiyle, HPV-DNA pozitiflik oranı %3, yüksek riskli HPV-DNA pozitif olan kadınların oranı ise %2.1 olarak belirlenmiştir. Yapılan bir meta-analizde toplam 78 çalışmanın verileri değerlendirilmiş, normal sitolojiye sahip kadınlar arasında global HPV prevalansı %10.4 olarak bulunmuş ve bölgeler arasında önemli değişiklikler saptanmıştır¹⁵. Avrupa ülkelerinde 18 çalışmanın verilerinin kullanıldığı bir meta-analizde ise, 30-64 yaş arası kadınlarda yüksek riskli HPV prevalansı İspanya’da %2 iken Belçika ve Fransa’da yaklaşık %12’ye kadar ulaşmaktadır¹⁶. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise, HPV

Tablo IV. Pap Yayması Sonuçları ile Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması

HPV genotipi	Pap yayması					
	Negatif	Yetersiz yayma	ASCUS	AGUS	LGSIL	HGSIL
Yüksek riskli						
16 (n= 12)	9		1		1	1
18 (n= 4)	4					
51 (n= 2)			1			1
56 (n= 1)	1					
58 (n= 1)	1					
Birden fazla genotip						
16, 33 (n= 1)			1			
16, 70 (n= 1)	1					
16, 90 (n= 1)	1					
70, 90 (n= 1)	1					
Muhtemel yüksek riskli						
66 (n= 3)	2		1			
90 (n= 9)	8		1			
Düşük riskli						
6 (n= 2)	1		1			
11 (n= 1)		1				
34 (n= 2)	2					
42 (n= 1)	1					
70 (n= 2)	2					
Tiplendirilemeyen (n= 9)	9					
HPV-DNA negatif (n= 99)	66	2	27	3	0	1

insidansının %2.1-16.4 arasında değiştiği bildirilmiştir¹⁷⁻²⁰. Özalp ve arkadaşları¹⁷, 2011 yılında Eskişehir’de 615 poliklinik hastasında yaptıkları çalışmada, 26 (%4.2) hastada HPV-DNA pozitifliği saptamışlardır. Öztürk ve arkadaşları¹⁸, Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran ve yaşları 18-62 arasında değişen, rastgele seçilen hastalarda HPV-DNA pozitifliğini %4.9 olarak bulmuşlardır. İnal ve arkadaşlarının¹⁹ 2002-2005 yılları arasında, HC2 testini kullanarak yaptıkları ve servikal intraepitelyal lezyon ile HPV ilişkisinin araştırıldığı, 1353 kadını içeren çalışmasında, HPV-DNA pozitifliği %2.1 oranında saptanmıştır. Akcalı ve arkadaşları²⁰, Manisa’da Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Jinekoloji polikliniğine başvuran 410 hastada yaptıkları çalışmada HPV pozitiflik oranını %8.5 olarak belirlemişlerdir. Yapılan çalışmalarda; seçilen popülasyonun sosyokültürel ve demografik özellikleri, kullanılan yöntemler, çalışma için alınan örneğin kalitesi gibi nedenlere bağlı olarak farklı ülkelerde ve ülkemizin farklı bölgelerinde, HPV-DNA pozitiflik oranlarında değişiklikler olduğu görülmektedir.

Araştırmamızda, katılımcıların %4.3 (47/1081)’ünde Pap yayması sonucu pozitif (anormal) saptanmış; bunların 4 (%8.5)’ünde HC2 yöntemi ile yüksek riskli HPV tipi belirlenmiştir. Sitolojisinde hücresel anormallik izlenmeyen kadınlarda ise, HC2 yöntemiyle, HPV

pozitifliği %2.6 (27/1034), yüksek riskli HPV saptanma oranı ise %1.8 (n= 19) olarak bulunmuştur. FDA ve IVD (In Vitro Diagnostic) onaylı HC2 testi, daha güvenilir olarak kabul edildiğinde, Pap yaymasının duyarlılığı %16.1, özgüllüğü %96, pozitif prediktif değeri %10.6, negatif prediktif değeri ise %97.5 olarak saptanmıştır. Görüldüğü gibi, sitolojisi negatif olarak raporlanan bu 27 kadın, sadece sitolojik açıdan taranmaları halinde gözden kaçırılacak ve HPV yönünden riskli grupta olmalarına rağmen, ASCCP’nin önerilerine göre yetersiz ve hatalı takip edilmiş olacaktırlar.

Laboratuvar kalite kontrolü gereği, ASCUS (önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücre) tanısı sıklığının, SIL (skuamöz intraepitelyal lezyon) tanısının 2-3 katından fazla olmaması gerekmektedir. Katılımcıların tamamı (n= 1081) baz alındığında, örneklerimizdeki ASCUS/SIL (40/4) oranı 10 olarak hesaplanmış olup, Bethesda’nın vermiş olduğu oranın oldukça üzerindedir²¹. Sitolojik değerlendirmenin sitopatologlar tarafından yapılamamasından kaynaklanabilecek bu yüksek oran ASCUS raporlarının gereksiz fazlalığı ya da SIL’lerin atlanması anlamına gelmektedir.

Bu çalışmada, sitoloji sonuçları negatiften HGSIL’e doğru artan epitel anormallliği şeklinde sınıflandırıldığında yüksek riskli HPV pozitiflik oranının en yüksek HGSIL’de (%33.3), en düşük ise negatif sitoloji sonuçlarında (%1.8) olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Wu ve arkadaşları³ Çin’de, 17-54 yaş arası 4215 kadında yaptıkları çalışmada, HPV prevalansını %14.3, sitolojik anormallik oranını ise %11 olarak saptamışlar ve HPV prevalansının, sitolojideki ciddiyet ile arttığını bildirmişlerdir. Ancak çalışmamızın ikinci kısmında değerlendirilen 152 kadını içeren grupta (HC2 ile pozitif saptanan 32 kadın bu gruptadır), sitolojisinde anormallik gözlenen 40 (%26.3) kadın bulunmaktadır. Bu 40 örneğin beşinde (%12.5) HC2 ile HPV varlığı saptanırken, konsensus RT-PCR ile dokuzunda (%22.5) HPV-DNA varlığı gösterilmiştir. Buna karşın, Pap yayması normal olarak raporlanmış veya değerlendirilememiş olan 112 örneğin 17’sinde, RT-PCR ile yüksek riskli HPV, 11’inde ise muhtemel yüksek riskli HPV olmak üzere toplam 28 örnekte (%25) HPV-DNA belirlenmiştir. Bu durum, örneğin patolojik olarak yanlış değerlendirilmiş veya HPV pozitif olmasına rağmen, henüz sitolojik bulguların ortaya çıkmamış olmasıyla açıklanabilir.

Araştırmanın ikinci aşamasında, HC2 yöntemiyle pozitif bulunan 32 (32/152; %21) örneğin de içinde bulunduğu 152 örneğin 53’ünde (%34.9) konsensus RT-PCR ile HPV-DNA varlığı saptanmıştır. Bu grupta, HC2 ve RT-PCR yöntemleri arasındaki uyumun karşılaştırılmasında, her ne kadar 0.665 olarak hesaplanan Cohen’s kappa değerine göre önemli derecede uyumluluk belirlense de, her iki yöntemin pozitiflikleri arasındaki fark dikkate alındığında, orta düzeyde bir uyumluluktan söz etmenin daha doğru olacağı düşünülmektedir.

Kulmala ve arkadaşlarının²², yüksek riskli HPV varlığı saptama açısından HC2 ile GP05+/GP06+ primerlerini hedef alan bir PCR yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada, HC2 testinin pozitiflik oranı %33.7, PCR’nin ise %36.6 olarak bulunmuş ve önemli derecede (κ : 0.669) uyumluluk saptanmıştır. Almanya’da Klug ve arkadaşları²³, HC2 ve PCR *line blot assay* (LBA) yöntemleriyle HPV tiplerinin dağılımını çalışmışlar ve yüksek riskli HPV enfeksiyon prevalansını HC2 testi ile %6.4, PGMY09/11 PCR LBA testi ile ise %4.3

olarak bulmuşlardır. Ülkemizde PCR kullanılarak yapılan çalışmalarda, HPV saptanma oranı ortalama %8.5 iken, HC ile bu oran ortalama %4 oranında saptanmıştır²⁴.

Pirodizilemeye dayalı ticari sistem ile yapılan genotiplendirmede, HC2 ve konsensus RT-PCR ile pozitif bulunan 32 örneğin 30 (%93.8)'unda genotip belirlenirken, iki örnekte tiplendirme yapılamamıştır. Diğer taraftan, HC2 testi ile negatif bulunan 21 örnek, RT-PCR yönteminde pozitif sonuç vermiş; pirodizilemede bunların 14 (%66.7)'ü tiplendirilmiş, ancak yedisinde (%33.3) tip tayini yapılamamıştır. Pirodizilemeye dayalı ticari sistem ile tiplendirmesi yapılamayan toplam dokuz örneğin ikisi, HC2 yönteminde; biri yüksek riskli HPV, diğeri düşük riskli HPV olarak tanımlanmış; diğer yedi örnek HC2 ile negatif olarak saptanmıştır. Konsensus RT-PCR ile daha fazla pozitiflik saptanması, HC2'nin muhtemel yüksek riskli tipleri belirleyememesi ile kısmen açıklanabilir. Ayrıca iki moleküler yöntemin alt saptama limitlerinin farklılığı ve/veya testlerin eş zamanlı farklı örneklerde çalışılması ve/veya örnek alımı sırasındaki kanama gibi örnek kalitesini etkileyebilecek durumların olması da bu iki moleküler test arasında farklılıklara neden olmuş olabilir. Konsensus RT-PCR ile pozitif saptanıp pirodizileme ile tiplendirilemeyen örneklerde ise, HPV miktarının, muhtemelen pirodizilemeye dayalı ticari sistemin saptama limitinin altında olduğu düşünülmüştür.

HC2 testi ile yüksek riskli grupta saptanan toplam 22 örneğin pirodizilemeye dayalı ticari sistem ile yapılan genotiplendirmesinde; 16'sı yüksek riskli, ikisi muhtemel yüksek riskli, üçü çoklu genotip (üçü de yüksek riskli tip içeren) olarak tiplendirilirken, birinde tip belirlenememiştir. HC2 yönteminde, düşük riskli grupta saptanan üç örnek ve yüksek riskli grupta saptanan iki örnek pirodizilemeye dayalı ticari sistem ile muhtemel yüksek riskli genotip olarak belirlenmiş; HC2 ile düşük riskli grupta saptanan bir örnek ise pirodizilemede yüksek riskli genotip olarak tiplendirilmiştir. HC2 ile hem yüksek hem düşük riskli HPV saptanan bir örnek ise, pirodizilemeye dayalı ticari sistemde sadece yüksek riskli genotip olarak saptanmıştır. Bu farklılıkların nedeni, HC2'nin muhtemel yüksek riskli tipleri belirleyememesi ve/veya yakın tipler arasındaki muhtemel çapraz reaksiyonlarla açıklanabilir. Pirodizilemeye dayalı ticari sistem ile genotip tayini yapılabilen örnekler arasında, Eskişehir bölgesinde en çok saptanan tipler sırasıyla; kadınlarda SK'den en çok sorumlu tutulan tip 16 (%34.1), tip 18 (%9.1) ve tip 90 (%25) olmuştur.

HPV genotiplerinin prevalansının araştırıldığı farklı çalışmalarda, en çok saptanan genotipler tip 16 ve 18 olarak bildirilmiştir^{15,16}. Kulmala ve arkadaşları²⁵, HPV tespiti için HC2 ve genotiplendirme için RT-PCR testini kullanarak yaptıkları çalışmada, en yaygın tip olarak %34.3 ile HPV 16'yı, ikinci yaygın tip olarak ise %14.3 ile HPV 31'i bildirmişlerdir. Özalp ve arkadaşlarının¹⁷ Eskişehir'de yaptıkları bir çalışmada, en yaygın tipler sırasıyla; HPV tip 16, tip 18 ve tip 51 olarak belirlenmiştir. Ergünay ve arkadaşları²⁶ da, araştırmalarında en sık HPV tip 16'yı saptamışlar, bunu sırasıyla tip 53 ve tip 81'in izlediğini ifade etmişlerdir. Ardıç ve arkadaşları²⁷ ise, en çok saptanan HPV tipini, tip 33 olarak bulmuşlar, bunu tip 16 ve tip 31'in izlediğini bildirmişlerdir. Manisa'da Akcalı ve arkadaşlarının²⁰ çalışmasında, yine tip 16 en sık rastlanan tip olarak belirlenirken bunu tip 45 ve tip 53 izlemiştir. Bizim araştırmamızda da, en çok saptanan tipler arasında HPV 16 ilk sırayı almış,

ikinci sırada HPV 90’ın olduğu izlenmiştir. HPV tip 90’daki bu yüksek oran, tipler arasında çapraz reaksiyon olabileceğini akla getirmektedir.

Birden fazla HPV tipi ile olan enfeksiyonlar yaygın olarak görülmektedir. Bizim çalışmamızda, 152 örneğin dördünde (%2.6) birden fazla HPV tipi ile pozitiflik saptanmış, bunlardan birinin Pap test sonucu ASCUS olarak belirlenmiştir. Dünya genelinde 15 bölgeden yapılan analizlerde, birden fazla HPV tipi ile enfeksiyon oranının %0.3-11.8 arasında değiştiği belirlenmiştir¹⁵. Bazı çalışmalarda ise, birden fazla HPV tipi ile enfeksiyon ve klinik durumun ciddiyeti arasında ilişki olduğu bildirilmiştir²⁸. Bu nedenle HPV nedenli kanserlerin önlenmesinde yüksek riskli tip ve birden fazla tip HPV ile enfeksiyonların belirlenerek yakından takip edilmesinin en doğru yaklaşım olacağı açıktır.

Bu çalışmada, Pap yayması sonuçları ile moleküler yöntemler arasında kısmen uyumsuzluklar gözlenmiştir. HPV enfeksiyonu ile servikal kanser (SK) arasındaki güçlü etiyolojik ilişki ve ülkemizdeki sitopatolog sayısının yetersizliği göz önüne alındığında; riskli hastaların atlanmaması veya gereksiz yere hasta takibi, invazif girişimler, bunun getireceği ekonomik maliyet ve kadınların yaşayacağı psikolojik stres düşünüldüğünde, ASCCP ve FDA’nın da önerileri ile SK taramasında Pap testine ilave olarak moleküler bir testin kullanılmasının gerekliliği çok açıktır. Bilindiği gibi, SK taramalarında özellikle yüksek riskli HPV tiplerinin erken dönemde belirlenerek, bu grup kadınların yakından izlenmesi ve/veya HPV-DNA negatif kadınların da isteğe bağlı aşıyla koruma altına alınması; bu hastalıkla savaşta klinik ve epidemiyolojik açıdan büyük önem taşımaktadır. Sonuç olarak, toplumdaki tüm bireyler HPV enfeksiyonu, sonuçları ve korunma yöntemleri konusunda bilinçlendirilmeli, aşı ve SK taraması uygun popülasyonlara, önerilen programlar doğrultusunda en etkin şekilde yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Arman D, Özdemir K. Human papillomavirus aşıları. *Flora İnfek Hast Klin Mikrobiyol Derg* 2012; 17(1): 18-21.
2. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* 2010; 117(2 Suppl): S5-10.
3. Wu EQ, Liu B, Cui JF, et al. Prevalence of type-specific human papillomavirus and pap results in Chinese women: a multi-center, population-based cross-sectional study. *Cancer Causes Control* 2013; 24(4): 795-803.
4. Bhatla N, Singla S, Awasthi D. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in developed countries. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012; 26(2): 209-20.
5. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 519619.
6. Köse MF, Turan T, Naki MM. Human Papillomavirus ile ilişkili hastalıklar. *Flora İnfek Hast Klin Mikrobiyol Derg* 2012; 17(1): 22-33.
7. Wong AA, Fuller J, Pabbaraju K, Wong S, Zahariadis G. Comparison of the hybrid capture 2 and cobas 4800 tests for detection of high-risk human papillomavirus in specimens collected in Preserv Cyt Medium. *J Clin Microbiol* 2011; 50(1): 25-9.
8. Erickson BK, Alvarez RD, Huh WK. Human papillomavirus: what every provider should know. *Am J Obstet Gynecol* 2013; 208(3): 169-75.

9. Kulasingam SL, Havrilesky L, Ghebre R, Myers ER. Screening for cervical cancer: a decision analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. AHRQ Publication no:11-05157-EF-1. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; May 2011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92546/>
10. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol* 2011; 12(7): 663-72.
11. Ortaç F, Taşkın S. HPV DNA testleri ve taramadaki önemi. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik Özel Derg* 2009; 2(1): 34-7.
12. Şahiner F. Genital insan papillomavirus enfeksiyonlarının moleküler tanısında karşılaşılan sorunlar ve yeni gelişmeler. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(4): 689-706.
13. Barbieri D, Nocera M, Gallinella G, et al. Comparison of HPV sign genotyping test with INNO-LIPA HPV genotyping extra assay on histologic and cytologic cervical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74(1): 43-8.
14. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990; 71(Pt 1): 173-81.
15. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague 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.
16. De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S. HPV infection in Europe. *Eur J Cancer* 2009; 45(15): 2632-9.
17. Ozalp SS, Us T, Arslan E, Öge T, Kaşıfoğlu N. HPV DNA and Pap smear test results in cases with and without cervical pathology. *J Turk Ger Gynecol Assoc* 2012; 13(1): 8-14.
18. Öztürk S, Kaleli İ, Kaleli B, Bir F. Servikal örneklerde insan papillomavirus DNA varlığının hibrid yakalama yöntemiyle araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38(3):223-32.
19. Inal MM, Köse Ş, Yıldırım Y, et al. The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17(6): 1266-70.
20. Kcali S, Goker A, Ecemis T, Kandiloglu AR, Sanlidag T. Human papillomavirus frequency and genotype distribution in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(1):503-6.
21. Kurman RJ. Descriptive diagnoses definitions, criteria, and explanatory notes, pp: 9-81. In: Solomon D (ed), *The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses*. 1994, Springer-Verlag, New York.
22. Kulmala SM, Syrjanen S, Shabalova I, et al. Human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6): 2470-5.
23. Klug SJ, Hukelmann M, Hollwitz B, et al. Prevalence of human papillomavirus types in women screened by cytology in Germany. *J Med Virol* 2007; 79(5): 616-25.
24. Dursun P, Senger SS, Arslan H, Kuşçu E, Ayhan A. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 191.
25. Kulmala SM, Shabalova IP, Petrovitchev N, et al. Prevalence of the most common high-risk HPV genotypes among women in three new independent states of the former Soviet Union. *J Med Virol* 2007; 79(6): 771-81.
26. Ergünay K, Misirlioğlu 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(2): 273-82.
27. Ardiç N, Öztürk O, Ergünay K, Sezer O. Investigation of E6/E7 mRNAs of high risk human papilloma virus types by a commercial automatized NASBA assay in cervical swabs. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(3): 463-9.
28. Tran LT, Tran LT, Bui TC, et al. Risk factors for high-risk and multi-type human papillomavirus infections among women in Ho Chi Minh City, Vietnam: a cross-sectional study. *BMC Womens Health* 2015; 15:16.