ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2016; 30 (2): 71- 75
http://www.fusabil.org

Uterin Servikal Kanser Örneklerinde Pyrosequening Yöntemi ile Human Papillomavirus Genotiplerinin Belirlenmesi*

Yasemin BULUT [1]
Mesut BELHAN [2]
İbrahim Hanifi ÖZERCAN [2]

[1]Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

[2]Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Amaç: Human papillonavirus (HPV) servikal kanserlerin primer etiyolojik ajanı olarak değerlendirilir. HPV genotiplerinin tespiti için kullanılan moleküler testler aşılama stratejisinin oluşturulmasında ve epidemiyolojik amaçla oldukça önemlidir. Pyrosequencing yöntemi HPV genotiplerinin belirlenmesinde kullanılan yeni bir yöntemdir. Bu çalışmada pyrosequencing yöntemi ile uterin servikal kanseri tanısı olan hastaların HPV genotiplerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 38 parafin bloktaki servikal kanser ve on kanser negatif servikal doku örneği kullanıldı. Örneklerin HPV pozitifliği real time-PCR yöntemi ile tespit edildi. Daha sonra, HPV pozitif olarak tespit edilen örneklerden HPV genotipleri pyrosequencing yöntemi kullanılarak belirlendi.

Bulgular: Real time-PCR sonucunda, 38 adet servikal kanser örneğinin 35 (%92)'inde HPV DNA pozitif saptandı. HPV DNA pozitif örneklerin 26 (%68.42)'sında HPV 16, iki (%5.26)'sinde ise HPV 18 tespit edildi. Bir (%2.6) hastada HPV 16 ile HPV 18'in, dört (%10.5) hastada HPV 16 ile HPV 16 Africian subtip 1'in, bir (%2.6) hastada HPV 16 ile HPV 33 ve bir (%2.6) hastada ise HPV 16 Africian subtip 1 ile HPV 16 Africian subtip 2'nin süper infeksiyonları belirlendi. On adet kanser negatif kontrol servikal doku örneklerinde ise HPV pozitifliği tespit edilmedi.

Sonuç: Çalışma sonuçlarına göre HPV 16 infeksiyonlarının servikal kanserin en önemli etkeni olduğu gösterildi. Pyrosequencing yöntemi ile HPV genotiplerinin belirlenmesi diğer klasik DNA dizi analizi yöntemlerine göre kolay ve ucuzdur. Bu nedenle, HPV genotiplendirme için pyrosequencing yöntemini önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *Genotip, human papillomavirus, HPV, pyrosequencing, uterin servikal kanser*

Detection of Human Papillomavirus Genotypes by Pyrosequencing Method in Uterine Cervical Cancer Samples

Objective: Human papillomavirus (HPV) is considered as the primary etiologic agent of cervical cancer. The detection of HPV genotypes are very important for the detection of vaccine strategy and epidemiological purpose. The pyrosequencing method is one of the new methods used for HPV genotypes. In this study, detection of HPV genotypes were aimed by pyrosequencing method in patients with uterine cervical cancer.

Materials and Methods: For this study, 38 paraffin-embedded cervical cancer and ten cancer negative cervical samples were used. HPV DNA in samples were determined by real time-PCR. Then, HPV genotypes were determined from HPV DNA positive samples using pyrosequencing.

Results: According to the results of real time-PCR, 35 (92%) of 38 samples were found as positive for HPV DNA. With pyrosequencing of 35 HPV DNA positive samples, it revealed that HPV 16 was detected in 26 (68.42%), HPV 18 in 2 (5.26%), HPV 16 and Africian subtype 1 super-infection in four samples (13.15%) while HPV 16 and HPV 18 super-infection was found in one (2.63%), HPV 16 Africian subtype 1 and HPV 16 Africian subtype 2 in one (2.63%) and finally HPV 16 and HPV 33 super-infection were detected in other one (2.63%). Ten cancer negative cervical samples were found as negative for HPV DNA.

Conclusion: According to these results, HPV 16 were shown to be the most important genotypes. Identification of HPV genotypes with pyrosequencing is cheaper and easier as compared to other methods such as classic nucleotide sequencing method. Thus, we suggest to use pyrosequencing method for genotyping of HPV.

***Key Words*:** *Genotype, human papillomavirus, HPV, pyrosequencing, uterine cervical cancer*

Geliş Tarihi : 19.08.2016
Kabul Tarihi : 20.12.2016

Yazışma Adresi
Correspondence

Yasemin BULUT

Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Elazığ–TÜRKİYE

ybulut@firat.edu.tr

* Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP) tarafından finansal olarak (Proje No: TF.11.33) desteklenmiştir.

Giriş

Servikal kanser, kadınlarda, göğüs kanserinden sonra, ikinci en yaygın kanser türüdür. Human papillomavirus (HPV) infeksiyonu cinsel yolla bulaşan en yaygın viral infeksiyonlardan biri olup kadın ve erkeklerin en az %50'si yaşamları boyunca HPV infeksiyonu ile karşılaşırlar (1). HPV, servikal kanser dışında, vulvar, vaginal, anal ve penil kanser ile genital siğiller ve respiratuvar papillomamatosis lezyonları ile de ilişkilidir (2-4).

HPV, *Papillomaviridae* ailesinin bir üyesi olup, genom dizi analizine göre şimdiye kadar 100'den fazla genotipi identifiye edilmiştir. Bu genotiplerin 40'dan fazlasının genital bölgede infeksiyona sebep olduğu belirlenmiştir (5, 6). Papillomaviruslar, farklı anatomik bölgelere eğilim göstermeleri ve oluşturdukları lezyon tiplerine göre subtiplere ayrılırlar. Genital HPV tipleri servikal kanser ile epidemiyolojik ilişkilerine göre kategorize edilir. HPV genotipleri prekanseröz lezyon ve servikal kanserle ilişkilerine göre, sıklıkla, yüksek risk ve düşük risk HPV tipleri olarak sınıflandırılır. Servikal kanserden en az 15 HPV genotipi sorumlu olup en çok izole edilen yüksek risk tipler HPV 16 ve 18 tipleridir. Düşük risk HPV tiplerinden HPV 6 ve 11 ise genital siğillerin %90'ından fazlasının etkenidir (3).

Ülkemizde yapılan laboratuvar çalışmaları HPV infeksiyonunun yaygın olduğunu göstermektedir (4, 7, 8). Günümüzde yüksek riskli belirli HPV tiplerine karşı koruma sağlayabilen aşıların geliştirilmesi ve bu aşıların birçok ülkede kullanım lisansı almış olması, bölgesel tip dağılımı verilerinin önemini arttırmıştır. HPV spektrumunun çeşitliliği ve yüksek insidansı, HPV tiplerinin belirlenmesinde güvenilir metotların kullanılmasını gerekli kılmıştır.

HPV tanısı için kullanılan moleküler testler, özellikle de tiplendirmeye yönelik testler, sadece tanı amaçlı değil aşı stratejisinin oluşturulmasında epidemiyolojik amaçlı kullanım için de gereklidir. Yine HPV tiplendirilmesi yalnızca riskli genotipleri belirlemek amacıyla değil aynı zamanda aşı stratejini belirlemek amacıyla da önem arz etmektedir. Genotiplendirme amacıyla da farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır (6, 8, 9).

Pyrosequencing yöntemi birçok mikrobiyal etkenin tanısı ve özellikle de HPV gibi çok sayıda genotipi olan etkenlerin doğrudan tiplendirilmesinde kullanılan amplifikasyon ve dizilemeyi bir arada yapabilen yeni bir yaklaşımdır (10). Mevcut çalışmada pyrosequencing yöntemi ile serviks kanserlerinde HPV genotiplerinin tespiti amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hastaların seçimi ve örneklerin toplanması: Çalışma için Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Değerlendirme Komisyonunda gerekli onaylar alındı. Bu çalışmada kullanılan materyaller Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarından arşiv taraması sonucu elde edildi. Örnek grubu, skuamöz intraepitelyal neoplazi, lowgrade, skuamöz intraepitelyal neoplazi, high grade, skuamöz karsinom insitü ve invaziv skuamöz karsinom olarak tanımlanan toplam 38 parafin blok seçilerek oluşturuldu. Patolojik olarak uterin servikal kanseri tanısı için rutin histopatolojik uygulamalardan, tespit, takip, bloklama, kesme ve boyama işlemleri sırasıyla gerçekleştirildi. Negatif kontrol grubu olarak ise 10 adet tümör yapısı göstermeyen uterin servikal doku örneği kullanıldı.

Parafin blok kesitlerinden DNA izolasyonu: Örneklere DNA izolasyonu Qiagen REPLI-g FFPE DNA izolasyon kiti ile üretici firmanın (QIAGE Co., A.B.D.) önerileri doğrultusunda yapıldı. İzolasyon protokolü aşağıdaki sıraya göre uygulandı. Kısaca, parafine gömülü doku bloğundan 5 ile 10 µm kalınlığında bir doku parçası mikrotom üzerinde kesilerek mikrosantrifüj tüpü içine aktarıldı. Bu dokuların üzerine FFPE eritme solüsyonu bırakıldı. Parafini eritmek için 10 dakika 95°C'de örnek inkübe edildi. Bu süre sonunda örneklere 2 µL proteinaz K solüsyonu eklendi. Örnekler önce 60°C'de 60 dakika ve daha sonra 95°C'de 10 dakika inkübe edildi. Santrifüj işlemini takiben yeni bir mikrosantrifüj tüpü içine parçalanmış doku kesitinden 10 µL aktarıldı. Bunun üzerine 10 µL FFPE master karışımı eklendi. Örnekler 24°C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon durdurulması amacıyla örnekler 95 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve örneklerin üzerine buz kullanarak ortam ısısı 4°C'ye düşürüldü. Bu esnada REPLI-g master miks hazırlandı ve örnek üzerine 30 µL REPLI-g master karışımı eklendi. Örnekler 30°C'de 8 saat boyunca inkübe edildi. 95°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilerek reaksiyon durduruldu. Santrifüj sonrası DNA örnekleri elde edildi ve kullanılıncaya kadar –80°C'de saklandı.

HPV DNA PCR aşaması: Elde edilen HPV DNA'ları ve HPV Pyrosequencing kitinde (QIAGEN Co., Almanya) mevcut HPV spesifik primerler kullanılarak PCR kuruldu. Ayrıca, kitte bulunan insan β-globin geni primerleri çalışma boyunca internal kontrol olarak kullanıldı. PCR için master miks hazırlanırken her bir örnek başına 20 µL 5X PCR buffer (Mg_2^+), 2 µL dNTP Miks (Her bir dNTP'den 10 mM), 3 µL 50 mM Mg_2^+ solüsyon, 1 µL ExTaq HS (5U/µL), 5 µL Eva GreenDye (Distile suda içinde 20X), 3 µL HPV/ β -globin primeri ve 56 µl su kullanıldı. Reaksiyon tüplerinin her birine HPV DNA'sından 10 µL eklendi. Örnekler Rotor-GeneTM 600 cihazının içine transfer edildi. Rotor-GeneTM 600 cihazı (QIAGEN real-time PCR cycler, QIAGEN Co., Almanya) içerisindeki örnekler için PCR amplifikasyonları, 94°C'de 1 dakika, 40°C'de 2 dakika, 72°C'de 1,5 dakika olmak üzere 40 döngü ve 72°C'de 5 dakika son uzatma olarak gerçekleştirildi.

Pyrosequencing: Mevcut çalışmada Rotor-Gene™ 6000 amplifikasyonunun ardından PyroMark Q96TM ID sisteminin (QIAGEN Co., Almanya) kullanıldığı sentez yoluyla dizileme prensibine dayalı pyrosequencing işlemi yapıldı. Sekans sonucunda elde edilen baz dizileriyle kütüphanedeki dizileri karşılaştırıldı ve PyroMark Q96 ID sistemiyle 30 baz çifti uzunluğundaki HPV'nin aşırı değişken genom bölgesinin sekansı sağlanarak genotiplendirme gerçekleştirildi.

Bulgular

Çalışmada kullanılan örnek grubunda 38 adet uterin servikal kanser tanısı konulmuş hasta yer almıştır. Bu hastaların yaş aralığı 25-65'dir. Bu hastalara patolojik olarak skuamöz intraepitelyal neoplazi, low grade, skuamöz intraepitelyal neoplazi, high grade, skuamöz karsinoma insitü ve invaziv skuamöz karsinoma tanısı konmuştur.

PCR işlemi sonrasında 38 adet örnekten 35 (%92.10) tanesinin HPV DNA'sı içerdiği tespit edildi. Bu 35 örneğin HPV genotipleri pyrosequencing işlemi sonucunda belirlendi. Kalan üç örnek ile negatif kontrol grubundaki on adet servikal kanser tanısı almayan doku örneğinin ise HPV DNA'sı içermediği görüldü ve sekans işlemi dışında bırakıldı. HPV 16 ve 18 genotiplerine ait pyrosequencing dizilimleri Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir

Pyrosequencing ile sekans sonuçlarına göre, 26 (%68.42) hastada HPV 16, iki (%5.2) hastada HPV 18 tespit edildi. Bir (%2.6) hastada HPV 16 ile HPV 18'in, dört (%10.5) hastada HPV 16 ile HPV 16 Africian subtip 1'in, bir (%2.6) hastada HPV 16 ile HPV 33 ve bir (%2.6) hastada ise HPV 16 Africian subtip 1 ile HPV 16 Africian subtip 2'nin süper infeksiyonları belirlendi. Özet olarak, uterin servikal kanser olgularında en yayın HPV tipinin HPV 16 olduğu kaydedildi. Ayrıca, bu sonuçlara göre 28 (%73.6) hasta tek bir HPV tipi ile infekte iken yedi (%18.4) hastanın ise birden fazla HPV ile infekte olduğu tespit edildi. Çalışma sonucunda belirlenen HPV genotipleri ve toplam hasta sayısındaki yüzdeleri Tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Uterin servikal kanser örneklerinde HPV 16 genotipe ait pyrosequencing sonucu

HPV16

Hit 1: Human papillomavirus type 16

Score: 100
Identities: 30/30 (100%)
Gaps: 0/30 (0%)

```
Query    1  ACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGC 30
            ||||||||||||||||||||||||||||||
Library  1  ACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGC 30
```

Tablo 2. Uterin servikal kanser örneklerinde HPV 18 genotipe ait pyrosequencing sonucu

HPV 18

Hit 1: Human papillomavirus type 18

Score: 100
Identities: 30/30 (100%)
Gaps: 0/30 (0%)

```
Query    1  TCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTC 30
            ||||||||||||||||||||||||||||||
Library  1  TCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTC 30
```

Tablo 3. Uterin servikal kanser örneklerinde saptanan HPV genotiplerinin yüzde (%) olarak dağılımı

HPV GENOTİPİ	SAYISI	YÜZDESİ (%)
HPV 16	26	68.4
HPV 16 + HPV 16 African type 1	4	10.5
HPV DNA Negatif örnekler	3	7.8
HPV 18	2	5,2
HPV 16 Africian type 1 + HPV 16 Africian type 2	1	2.6
HPV 16 + HPV 33 Isolate IS 827	1	2.6
HPV 16 + HPV 18	1	2.6
TOPLAM	**38**	**100**

Tartışma

HPV genotiplerinin saptanması epidemiyolojik olarak önemli olup klinik seyrin ve tedavinin planlanması açısından oldukça faydalıdır (3, 5, 6, 8). Mevcut çalışmada pyrosequencing yönteminin kullanılarak servikal kanserlerde belirlenen HPV DNA'larının tiplendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Servikal kanserlerde HPV'nin varlığıyla alakalı gerek ülkemizde gerekse diğer ülkelerde yapılmış çalışmaların tamamında farklı prevalans oranları tespit edilmiştir (11-18). Ülkemizde servikal kanser tanısı konmuş hastalarda yapılan çalışmalarda HPV 16 tipinin yaygın olduğu tespit edilmiştir. Usubütün ve ark. (19) 2009 yılında yayınlanan çalışmalarında 248 invaziv serviks kanseri örneğini incelemişlerdir. Bu çalışmada PCR aşamasını takiben, LIPA 25 DNA enzim immüinoassay ve genotiplendirme işlemleri gerçekleştirilmiş ve HPV prevalansı %93.5 (232/248) olarak bulunmuştur. Bu örneklerde HPV tiplerine göre dağılım ise HPV 16 (%64.7), HPV 18 (%9.9), HPV 45 (%9.9), HPV 31 (%3.0) ve HPV 33 (%2.2) şeklindedir.

Avcı ve ark. (20) 2013 yılında çeşitli servikal patolojiye sahip hastalarda real-time PCR ve DNA dizi analizi ile HPV tiplerinin sıklığı belirlemek amacıyla filogenetik analizleri yapmışlardır. Çalışma örneklerinin %61'inde HPV DNA pozitif tespit edilmiş olup bu örneklerin %52'sini HPV 16, %4'ünü HPV 16 ve HPV 11, %1'ini HPV 16 ve HPV 6, %4'ünü ise tiplendirilemeyen HPV DNA örnekleri oluşturmuştur.

Diğer ülkelerde servikal kanser tanısı konmuş hastalarda HPV varlığı saptanması ve tiplendirilmesine yönelik çalışmalarda da HPV 16'in yaygın olduğu tespit edilmiştir. İtalya'da yapılan bir çalışmada Verteramo ve ark. (16) 2000-2004 yılları arası jinekoloji polikliniğine başvuran 17-57 yaş arası 753 kadın hastada HPV DNA prevalansını %18.3 (138/753) bulmuşlardır. Bu hastalarda HPV 16 %14.18, HPV 53 %9.21, HPV 58 %7.80, HPV 66 ile HPV 6 ise %5.67 olarak tespit edilmiştir. İspanya'da Sanjose ve ark. (17) yaptıkları çalışmada %2.98 oranında HPV infeksiyonu bulmuşlar ve aynı çalışmada en yaygın tip %20.7 oranla ile HPV 16 olarak tespit edilmiştir. Kjaer ve ark. (18) Danimarka'da 2004-2005 yılları arasında yaptıkları çalışmalarında HPV 16'yı %4.8 ile en yaygın tip olarak bulmuşlar ve bunu sırasıyla HPV 31 (%3.8), HPV 52 (%3.7), HPV 51 (%3.6), HPV 68 (%2.4), HPV 18 (%2.2), HPV 39 (%2.2), HPV 66 (%1.9), HPV 53 (%1.9) ve HPV 45 (%1.8)'in izlediğini belirlemişlerdir.

Pyrosequencing yöntemi ile HPV genotipleri belirlenmesine yönelik çalışmalar 2000 yılından itibaren yayımlanmaya başlanmıştır (21-23). Gharizadeh ve ark. (21) tarafından 2001 yılında servikal kanser, displastik bireyler ve sağlıklı bireylerden oluşan farklı hastalara ait toplam 67 klinik örnek kullanılarak pyrosequencing yöntemi ile HPV genotipleri belirlenmiştir. Pyrosequencing sonuçlarına göre servikal kanser hastalarının %57 (20/35)'sinde HPV 16, %17 (6/35)'sinde HPV 18 ve % 9 (3/35)'unda HPV 31 belirlenmiştir. Travasso ve ark. (22) 2008 yılında Hindistan'da pyrosequencing yöntemi kullanarak HPV genotiplerini 65 servikal kanser biyopsi örneği ve 21 kanser olmayan servikal doku örneği olmak üzere toplam 86 klinik örnekte araştırmışlardır Çalışma sonucunda servikal kanser örneklerinde %73.8 (48/65)'inde HPV 16, %10.77 (7/65)'sinde HPV 18, %3.07 (2/65)'sinde HPV 33, %1.53 (1/65)'ünde HPV 31 ve %1.53 (1/65)'ünde HPV 45 varlığı rapor edilmiştir. Ülkemizde servikal örneklerde RT-PCR ile %34.9 oranında HPV DNA pozitifliği tespit edilmiş ve pozitif bulunan 44 örnekle yapılan pyrosequencing neticesinde %34.1'inde HPV 16, %25'inde HPV 90 ve %9.1'inde ise HPV 18'in varlığı rapor edilmiştir (23).

Mevcut çalışmada kullanılan uterin servikal kanser tanısı konulmuş 38 hastaya ait örneğin 35 (%92)'inde HPV DNA pozitif saptanmıştır. Yirmi altı (%68.42) hastada HPV 16 tek başına ve yedi (%18.42) hastada ise diğer HPV genotipleri ile birlikte varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ülkemizin diğer bölgeleriyle ve dünyada yapılan çalışmalarla uyumlu olup, HPV 16 infeksiyonlarının servikal kanserin en önemli etkeni olduğu gösterilmiştir.

Günümüzde HPV tespitinde non-amplifiye tekniklerle beraber Target ve Sinyal Amplifikasyon teknikleri kullanılmaktadır (10, 24). HPV tiplerinin onkojenik potansiyelleri farklı olduğundan, testler yalnızca örnekteki HPV DNA'sının varlığı değil, HPV tipini de tespit edebilmelidir. HPV tespitinde en fazla kullanılan teknik hybrid capture yöntemidir. Hybrid capture yönteminin ise birinci jenerasyon hybrid capture tüp test ve daha yeni hybrid capture II testi farklı uygulamaları bulunmaktadır. DNA sekans analizi tüm viral subtipleri ayırt eden ve altın standart olarak kabul edilen yöntemdir. Gerek amplifikasyon gerekse sekanslama yöntemini bir arada gerçekleştirilen bir yaklaşım olması sebebiyle pyrosequencing metodu HPV'nin genotiplendirilmesinde oldukça duyarlı bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (25).

Mevcut çalışmada pyrosequencing yöntemiyle uterin servikal kanser örneklerinde HPV genotiplerinin belirlenmesi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Fiyat ve süre açısından değerlendirildiğinde, pyrosequencing yönteminin diğer HPV tiplendirme yöntemlerine kıyasla daha uygun yaklaşım olduğu, bu nedenle de HPV genotipleme için rutin laboratuvarlarda uygulanabileceği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Loning M, Gissmann L, Diedrich K, et al. Human papillomavirus and cervical cancer. Dtsch Arztebl 2007; 104: 2806-2810.

2. Nyári TA, Kamlár L, Deák J, et al. Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection in asymptomatic women in southeastern Hungar. Eur J Obstet Gyn R B 2004; 115: 99-100.

3. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci 2006; 110: 525-541.

4. Deniz E, Bulut Y, Yuce H, et al. Investigation of the presence of human papillomavirus DNA in various gastrointestinal carcinoma samples. Mikrobiyol Bul 2009; 43: 259-268.

5. Hans-Ulrich B, Itzel E, Calleja-Macias S, et al. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. Int J Cancer 2006; 118:1071-1076.

6. Scheurer ME, Tortolero G, Adler K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. Int J Gynecol Cancer 2005; 15: 727-746.

7. Yarkın F. Human papillomavirus infeksiyonlarının virolojisi ve epidemiyolojisi. Klinik Aktüel Tıp 2007; 1: 1-6.

8. Bulut Y. HPV tanı ve tiplendirmesinde moleküler yöntemler. 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, 2010, Ankara.

9. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348: 518-527.

10. Gharizadeh B, Oggionni M, Zheng M, et al. A novel strategy for reliable and rapid genotyping of human papillomaviruses by pyrosequencing technology. J Mol Diagnos 2005; 5: 198-205.

11. Vardar MA, Altıntaş A, Doran F, et al. Human papillomavirus detection in cervical smears and cervical tissue excised by the Loop Electrosurgical Excision Procedure (LEEP). Eur J Gynecol Oncol 1995; 16: 494-499.

12. Güney AI, Ince U, Küllü S, et al. Detection and typing of human papillomavirus in cervical specimens of Turkish women. Eur J Gynecol Oncol 1997; 18: 546-550.

13. Altuglu I, Terek MC, Ozacar T, et al. The prevalence of human papillomavirus DNA in women with mucopurulent endocervicitis. Eur J Gynecol Oncol 2002; 23: 166-168**.**

14. Ozsaran AA, Dikmen Y, Akercan F, et al. The triage of squamous cell abnormalities of cervical cytology by human papillomavirus screening. Eur J Gynecol Oncol 2003; 24: 535-538.

15. Ozcelik B, Serin IS, Gokahmetoglu S, et al. Human papillomavirus frequency of women at low risk of developing cervical cancer: A preliminary study from a Turkish university hospital. Eur J Gynecol Oncol 2003; 24: 157-159.

16. Verteramo R, Pierangeli A, Calzolari E, et al. Direct sequencing of HPV DNA detected in gynecologic outpatients in Rome, Italy. Microbes and Infect 2006; 8: 2517-2521.

17. Sanjose SD, Almirall R, Lloveras B, et al. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. ASTDA 2003; 30: 788-793.

18. Kjaer SK, Breugelmans G, Munk C, et al. Population-based prevalence, type- and age-specific distribution of HPV in women before introduction of an HPV-vaccination program in Denmark. Int J Cancer 2008; 123: 1864-1870.

19. Usubütün A, Alemany L, Küçükali T, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer specimens from Turkey. Int J Gynecol Pathol 2009; 28: 541-548.

20. Avcı GA, Bozdayı G, Taşkıran C, ve ark. Çeşitli servikal patolojiye sahip kadınlarda HPV prevalansı ve filogenetik analizi. J Turk Soc Obstet Gynecol 2013; 10: 151-159.

21. Gharizadeh B, Kalantari M, Garcia CA, et al. Typing of human papillomavirus by pyrosequencing. Lab Invest 2001; 81: 23-28.

22. Travasso CM, Anand M, Samarth M, et al. Human papillomavirus genotyping by multiplex pyrosequencing in cervical cancer patients from India. J Biosci 2008; 33: 73-80.

23. Aslan FG, Us T, Kaşifoğlu N, et al. 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. Mikrobiyol Bul 2016; 5: 73-85.

24. Oztürk S, Kaleli I, Kaleli B, et al. Investigation of human papillomavirus DNA in cervical specimens by hybrid capture assay. Mikrobiyol Bul 2004; 38: 223-232.

25. Lillsunde LG, Carlsson J, Karlsson MG, et al. Evaluation of HPV genotyping assays for archival clinical samples. J Mol Diagn 2015; 17: 293-301.