

SERVİKS KANSERİ VE PREKANSERÖZ LEZYONLARINDA PCR İLE HPV TİPLEMESİ

Dilek YAVUZER,¹ Nimet KARADAYI,¹ Aykut ERDAĞI,¹ Taflan SALEPÇİ,²
Hüseyin BALOĞLU,³ Reşat DABAK⁴

Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ¹Patoloji Kliniği, ²Onkoloji Kliniği, ⁴Aile Hekimliği Bölümü;
³Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Patoloji Kliniği

Günümüzde serviks neoplazilerinde *human papillomavirus*'un (HPV) rolü kesin olarak kanıtlanmış olmakla birlikte, ülkemizde serviks lezyonlarındaki HPV prevalansı hakkında bilgilerimiz sınırlıdır. Bu çalışmada, serviks kanseri ve prekanseröz lezyonu olan kadınlarda HPV prevalansı ve HPV tipleri araştırıldı. İnvaziv serviks kanseri ve servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) tanısı almış 50 adet servikal doku örneği "*nested MY/GP polymerase chain reaction*" (PCR) ile HPV DNA varlığını araştırmak için tarandı. Servikal doku örneklerinin 22'si invaziv serviks karsinomu, 12'si CIN 3, 7'si CIN 2 ve 9'u ise CIN 1 idi. Elli olgunun 35 tanesinde (%70) HPV DNA tespit edildi. Tipleme yapıldığında, en sık rastlanan 3 HPV tipi sırasıyla, HPV 6/11 (%42,9), HPV 16 (%22,9) ve HPV 18 (%14,3) olarak bulundu. İki tip birden içeren HPV enfeksiyonu ise 7 olguda (%20) saptandı. Çalışma grubumuzdaki HPV prevalansı ve HPV tiplerinin dağılımı literatürde bildirilenlere göre farklıydı. Bu durum HPV görülme sıklığının ve HPV tiplerinin dağılımının coğrafi farklılıklar göstermesi ile ilişkili olabilir. Ayrıca olgu sayımız sınırlı olduğundan, ülkemizdeki HPV prevalansı ve HPV tiplerinin dağılımını daha doğru olarak belirlemede geniş serilerle yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Human papillomavirus; polimeraz zincir reaksiyonu; serviks kanseri; servikal intraepitelyal neoplazi.

HPV TYPING WITH PCR IN CERVICAL CANCEROUS AND PRECANCEROUS LESIONS

The role of human papillomavirus (HPV) in the etiology of cervical neoplasia is now well established, however in our country, the knowledge of HPV prevalence in cervical lesions is still limited. The aim of this study was to investigate the prevalence of HPV DNA and to determine HPV types distribution among women with cervical cancerous and precancerous lesions. Fifty cervical tissues with invasive cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) were screened by nested MY/GP polymerase chain reaction (PCR) for HPV DNA. Twenty-two samples were invasive cervical carcinoma, 12 were CIN 3, 7 were CIN 2 and 9 were CIN 1 lesions. Thirty-five out of 50 (70%) cervical tissues were positive for the HPV DNA. When typing was performed, the three most common HPV types were HPV 6/11 (42.9%), HPV 16 (22.9%) and HPV18 (14.3%), respectively. Dual HPV infections were found in 7 (20%) cases. HPV prevalence and type distribution in our study population were different to that reported worldwide. This might be related to the geographic differences of prevalence and distribution of HPV types around the world. However, as the number of study population was limited, the further and larger studies are needed to determine more reliable HPV prevalence and distribution of HPV types in Turkish women.

Key Words: Human papillomavirus; polymerase chain reaction; cervical cancer; cervical intraepithelial neoplasia.

Başvuru tarihi: 4.4.2009 **Kabul tarihi:** 24.4.2009

İletişim: Dr. Dilek Yavuzer. Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, 34865 Cevizli, İstanbul.

Tel: +90 - 216 - 441 39 00 /1051 **e-posta:** dilekyavuzer@yahoo.com

Human papillomavirus (HPV) birçok kanserde, özellikle anogenital ve baş-boyun kanserlerinde etyolojik ajan olarak kabul edilmektedir.^[1-3] Günümüzde yüzden fazla HPV tipi tespit edilmiş olup bunların yaklaşık 40 tanesi anogenital bölgeyi enfekte etmektedir. Bunların içinden 15 tipin (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) onkojenik açıdan yüksek risk grubunda, 3 tipin (26, 53, 66) orta derecede risk grubunda ve 12 tipin ise (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 ve 89) düşük risk grubunda yer aldığı belirlenmiştir.^[4,5]

Serviks kanseri, dünyadaki tüm kanserler arasında yedinci, kadınlardaki kanserler arasında ise ikinci sırada yer almaktadır.^[6] Onkojenik HPV tipleri ile oluşan enfeksiyonların hemen hemen tüm serviks kanserleri ve prekanseröz lezyonlarının etyopatogenezinde yer aldığı,^[1,4,7] özellikle HPV tip 16 ve 18'in tüm serviks kanserlerinin yaklaşık %70'inden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.^[4]

Serviks karsinomu ve prekanseröz lezyonlarının erken tanı ve tedavisinde sitolojik tarama testlerine ek olarak HPV DNA'sının tespiti ve HPV tipleneşi önemlidir.^[7] HPV DNA'sının tespitinde PCR ile DNA amplifikasyonu en spesifik ve hassas yöntemdir.^[5]

Çalışmamızda, serviks kanserleri ve prekanseröz lezyonlarında PCR ile HPV DNA'sının varlığı ve HPV tipleri araştırılmıştır.

HASTALAR VE YÖNTEM

Bu çalışmada Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği arşivinden invaziv serviks kanseri ve servikal intraepitelyal neoplazisi olan toplam 50 hasta seçildi. Hastaların *punch* biyopsi, leep, konizasyon ya da total abdominal histerektomi ve bilateral salpingoofektomi materyallerinden servikal lezyonu örnekleyen birer adet parafin blok ayrıldı. Her bir bloktan 10 µm'lik 4 kesit DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. DNA ekstraksiyonu standart bir kit ile yapıldı (QIAamp DNA mini kit, QIAGEN, Hiden, Germany). Ekstrakte edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü ve PCR için kullanılabilecek konsantrasyonda bulundu (tüm olgularda ≥ 70 ng/µl).

DNA integritesi hem elektroforetik bant paterni analizi hem de human beta globin geni için PCR amplikonu elde edilerek kontrol edildi.

HPV genomu taraması en çok kullanılan, en hassas yöntemlerden biri olan ve viral genomda L1 gen bölgesini hedefleyen nested MY/GP PCR yöntemi ile yapıldı.^[8-10] HPV genomu bulunan olgularda, takiben MPCR tekniği ile HPV-genotiplenmesi yapıldı. Daha önce tanımlanmış olan ve GP-E6/E7 olarak bilinen MPCR yöntemine dayalı genotiplenme stratejisi kullanıldı.^[9] MPCR amplikonlarının boyutlarına göre HPV genotiplendirmesi yapıldı. Özetle, 4 farklı MPCR reaksiyonu ile 18 HPV genotipinin tipleneşi hedeflendi. Bunlarda, 1. MPCR ile HPV tip 16, 18, 31, 59, 45; 2. MPCR ile HPV tip 33, 6/11, 58, 52, 56; 3. MPCR ile HPV tip 35, 42, 43, 44 ve 4. MPCR ile HPV tip 68, 39, 51, 66 identifikasyonu yapıldı. HPV DNA tarama ve tiplendirmesi için kullanılan primerler ve PCR yöntemleri Tablo I'de görülmektedir.

Tarama ve tipleneşi amaçlı PCR sonrasında ampliconlar %2'lik agaroz jelde 45 dakika 100 V'da elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonrasında jel etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışıkta jeldeki bant paternleri değerlendirildi.

BULGULAR

Elli adet servikal doku örneğinin 22 tanesi invaziv serviks karsinomu (skuamöz hücreli karsinom), 12 tanesi CIN 3, 7 tanesi CIN 2 ve 9 tanesi ise CIN 1 idi. Hastaların ortalama yaşı 47 olarak bulundu (dağılım 21-83 yaş). Hastalara ait tüm örneklerden yeterli DNA ekstraksiyonu yapıldı. Histopatolojik tanımlar, HPV pozitifliği ve HPV tipleri Tablo II'de özetlenmiştir.

Elli adet servikal dokunun 35'inde (%70) HPV DNA pozitif bulundu. Tipleneşi yapıldığında olguların 15'inde (%42,9) HPV 6/11 pozitifliği, 8'inde (%22,9) HPV 16 pozitifliği, 5'inde (%14,3) HPV 18 pozitifliği, 2'sinde (%5,7) HPV 6/11 ve 31 pozitifliği, 1'inde (%2,9) HPV 6/11 ve 16 pozitifliği, 1'inde (%2,9) HPV 6/11 ve 18 pozitifliği 3'ünde (%8,6) ise HPV 16 ve 18 pozitifliği saptandı. İnvaziv serviks kanseri olan 22 olgunun 15'inde (%68,2) HPV DNA pozitifliği saptandı (Şekil I).

Tablo I. HPV tarama ve tiplendirme stratejisi

Primer dizileri 5' → 3'	Termal döngü	50 µl PCR tüp içeriği	Amplikon boyu (bp)	Yöntem	
MY9:CGTCCMARRGGAWACTGATC MY11:CMCAGGGWCATAAAYAYTGG	95°C/5' X40 94°C/1' 55°C/1' 72°C/1' 72°C/7'	- 25µL Mastermiks ¹ - 50pmol MY9 - 50pmol MY11 - 100ng kalıp DNA		MY9 / MY11	MY/GP nPCR : HPV taraması için
GP5:TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC GP6:GAAAAATAAACTGTAATCATATT	95°C/5' X35 94°C/1' 40°C/2' 72°C/1.5' 72°C/7'	- 25µL Mastermiks ¹ - 50pmol GP5 - 50pmol GP6 - 2µL of MY9/11 amplikon ²	140	GP5 / GP6	
HPV-16 F:CACAGTTATGCACAGAGCTGC R:TATATTCATGCAATGTAGGTGTA	95°C/5' X35 94°C/30'' X °C ³ /30'' 72°C/45'' 72°C/4'	- 25µL Mastermix ¹ - 15pmol F primer - 15pmol R primer - 2µL of MY/GP product ²	457	1. grup MPCR	nMPCR: HPV genotiplendirmesi için
HPV-18 F:CACTTCACTGCAAGACATAGA R:GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA			322		
HPV-31 F:GAAATTGCATGAACTAAGCTCG R:CACATATACCTTTGTTGTCAA			263		
HPV-59 F:CAAAGGGGAACTGCAAGAAAG R:TATAACAGCGTATCAGCAGC			215		
HPV-45 F:GTGGAAAAGTGCATTACAGG R:ACCTCTGTGCGTTCCAATGT			151		
HPV-33 F:ACTATACACAACATTGAACTA R:GTTTTTACACGTCACAGTGCA			398	2. grup MPCR	
HPV-6/11 F:TGCAAGAATGCACTGACCAC R:TGCATGTTGTCAGCAGTGT			334		
HPV-58 F:GTAAGGTGTGCTTACGATTGC R:GTTGTTACAGTTACACTTGT			274		
HPV-52 F:TAAGGCTGCAGTGTGTGCAG R:TAATAGTTATTTCACTTAATGGT			229		
HPV-56 F:GTGTGCAGAGTATGTTTATTG R:TTTCTGTCAATGCAATTGC			181	3. grup MPCR	
HPV-35 F:CAACGAGGTAGAAGAAAGCATC R:CCGACCTGTCCACCGTCCACCG			358		
HPV-42 F:CCCAAAGTAGTGGTCCAGTTA R:GATCTTTTCGTAGTGTGCGAGTG			277		
HPV-43 F:GCATAATGTCTGCACGTAGCTG R:ATGAAACTGTAGACAGGCCAAG			219		
HPV-44 F:AAACAGTTATATGTAGTGTACCG R:TATCAGCACGTCCAGAATTGAC			163	4. grup MPCR	
HPV-68 F:GCAGAAGGCAACTACAACGG R:GTTTACTGGTCCAGCAGTGG			333		
HPV-39 F:GACGACCACTACAGCAAACC R:TTATGAAATCTTCGTTTGCT			280		
HPV-51 F:GAGTATAGACGTATAGCAGG R:TTTCGTTACGTTGTCGTGTACG	223				
HPV-66 F:TTCAGTGTATGGGGCAACAT R:AAACATGACCCGGTCCATGC	172				

¹ Mastermiks ticari bir karışım olup dNTPs, PCR tampon, MgCl₂ ve DNA polimeraz içerir (HotStarTaq Plus MasterMix Kit, QIAGEN, Hiden, Germany). F: Forward primer. R: Revers primer. ² Kalıp DNA olarak; ³ Bağlanma ısısı (X= 55-62°C arasında değişir) her MPCR reaksiyonu için optimize edilmiştir.

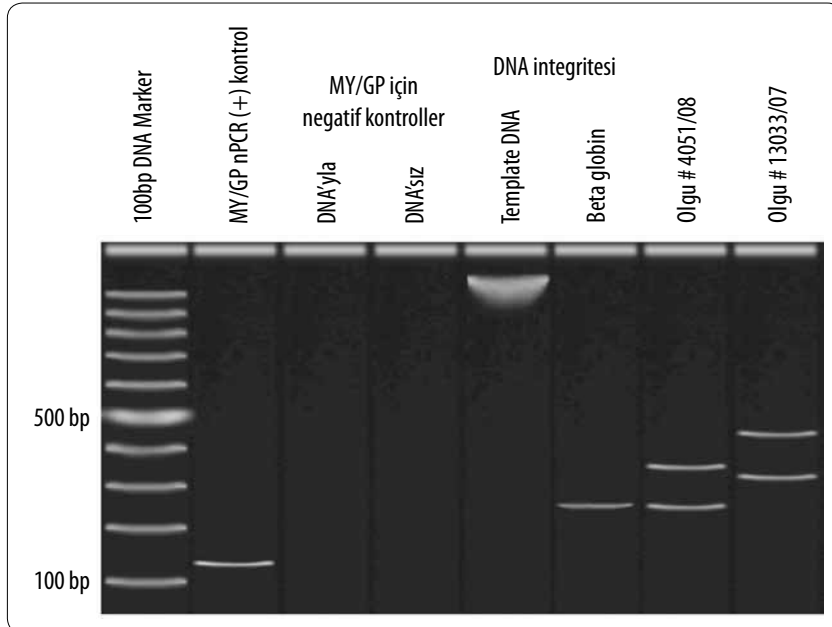
Tablo II. Histopatolojik tanılar, HPV pozitiflikleri ve HPV tipleri

Serviks lezyonu / HPV tipleri	CIN 1 (n=9)	CIN 2 (n=7)	CIN 3 (n=12)	İnvaziv serviks karsinomu (n=22)
Negatif	2 (%22,2)	5 (%71,4)	1 (%8,3)	7 (%31,8)
HPV 6/11	3 (%33,3)	1 (%14,3)	2 (%16,7)	9 (%40,9)
HPV 16	-	1 (%14,3)	6 (%50)	1 (%4,5)
HPV 18	3 (%33,3)	-	-	2 (%9,1)
HPV 31	-	-	-	-
HPV 6/11 ve 16	-	-	1 (%8,3)	-
HPV 6/11 ve 18	-	-	-	1 (%4,5)
HPV 6/11 ve 31	-	-	2 (%16,7)	-
HPV 16 ve 18	1 (%11,1)	-	-	2 (%9,1)
HPV 16 ve 31	-	-	-	-
HPV 18 ve 31	-	-	-	-

TARTIŞMA

Serviks uteri kanserleri dünyada kadınlar arasında ikinci en sık rastlanan kanser tipi olup 2002 yılında öngörülen yeni olgu sayısı 493.000, bu hastalıktan ölüm sayısı ise 274.000 olarak bildirilmiştir.^[1] Türkiye'deki kadınlar arasında görülme sıklığı açısından 9., kanser ölüm nedenleri arasında 13. sırada yer almaktadır.^[11]

HPV'nin servikal kanser ve prekanseröz lezyonlarının gelişiminde etyolojik faktör olduğu kanıtlandığından, HPV varlığını ve HPV tiplerinin dağılımını tespit etmek hastalığın tedavisinde ve son zamanlarda geliştirilen aşılama programlarının düzenlenmesinde önemlidir. Bu çalışmayı serviks kanseri ve prekanseröz lezyonu olan Türk kadın nüfusunda HPV görülme sıklığını ve tip dağılımını tespit etmek için planladık.



Şekil I. HPV tip 6/11 (262bp) ve tip 31 (334bp) [olgu 4051/08: dual infeksiyon] ile HPV tip 16 (457bp) ve tip 18 (322bp) [olgu 13033/07: dual infeksiyon] gösteren MY/GP nPCR pozitif örnekler.

Dünyada bu konu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Milutin Gasperov ve ark.^[5] sitolojik olarak yüksek grade'li skuamöz intraepitelyal lezyon tespit edilen Hırvat kadınlardan toplanan örneklerin %86,7'sinde PCR ile HPV pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışmada en çok rastlanan HPV tipleri HPV 16 ve 31 olarak bildirilmiştir. Diğer bir çalışma Güney Meksika'da serviks kanserli 133 kadında yapılmış ve olguların %100'ünde HPV pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışmada en sık görülen tipler HPV 16 ve 18 olarak bildirilmiştir.^[12] İtalya'da yapılan bir çalışmada CIN 1'i olan kadınlarda HPV 16 ve/veya 18 görülme sıklığı %34,1, CIN 2'li kadınlarda %57,5, CIN 3 ya da daha ileri lezyonu olanlarda ise %78,6 olarak bildirilmiştir.^[13] Kuzeybatı İran'dan bildirilen bir çalışmada ise serviksin prekanseröz ve kanseröz lezyonlarında HPV DNA prevalansı %64 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada en sık rastlanan HPV tipleri HPV 16 ve 31'dir.^[14] Avrupada farklı ülkelerden kadınları içeren bir meta-analizde, HPV 16 veya 18'in görülme sıklığı, CIN 1 lezyonlarda %29,4, CIN 2/3'lerde %61,4, invaziv serviks karsinomlarında ise %76,2 oranında bildirilmektedir.^[15]

Bizim çalışmamızda, invaziv serviks kanseri ve CIN lezyonu olan Türk kadın nüfusunda HPV pozitifliği %70 oranında bulundu. HPV pozitifliğini, CIN 1 lezyonlarda %77,8, CIN 2 lezyonlarda %28,6, CIN 3 lezyonlarda %91,7 ve invaziv karsinomlarda %68,2 olarak tespit ettik. En sık rastlanan HPV tipi HPV 6/11 idi. İkinci sıklıkla HPV16 üçüncü sıklıkla ise HPV 18 bulundu.

Ülkemizde genel nüfus ve servikal lezyonu olan kadınlardaki HPV prevalansı ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. CIN lezyonu olan 94 hastada RT-PCR metodu ile yapılan bir çalışmada HPV görülme oranı CIN 1, CIN 2 ve CIN 3 lezyonlarda sırasıyla %4,2, %14,8 ve %45 olarak bildirilmiştir.^[16] Ergünay ve ark.^[17] sitolojik olarak patoloji saptanan 35 servikal örnekte nested PCR kullanılarak HPV DNA varlığını araştırmışlar ve örneklerin %80'inde HPV DNA tespit etmişlerdir. Yine ülkemizde yapılan daha kapsamlı bir çalışmada invaziv serviks kanseri olan 248 vakada HPV prevalansı %93,5 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada en sık rastlanan HPV tipleri sırasıyla HPV 16,

18, 45, 31 ve 33 olarak bulunmuştur.^[18] Son olarak Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesinde, sitolojik olarak patoloji saptanan 93 kadın ve normal sitolojiye sahip 310 kadında HPV DNA varlığı araştırılmış ve sitolojilerinde patoloji saptanan kadınların %36'sında, normal sitolojiye sahip kadınların ise %20'sinde HPV DNA pozitifliği saptanmıştır. En sık rastlanan HPV tipleri ise HPV 16 ve HPV 6 olarak bildirilmiştir. Sadece yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar arasında ise görülme sıklığı açısından HPV 16 birinci sırayı alırken, HPV 6 ve HPV 18 ikinci sırada yer almaktadır.^[11] Bu çalışmada da düşük onkojenik potansiyele sahip HPV 6'nın bizim çalışmamızdaki gibi en sık rastlanan tiplerden biri olması dikkat çekicidir.

Sonuç olarak, bizim çalışmamızda serviks kanserleri ve prekanseröz lezyonlarındaki HPV prevalansı literatürde bildirilenlere göre farklılıklar göstermektedir. Özellikle CIN 2 ve invaziv serviks kanserlerinde HPV DNA'sı düşük oranlarda saptanmıştır. Buna karşılık CIN 1 ve CIN 3'de yüksek oranda bulunmuştur. Ayrıca ilginç olarak en sık rastlanan tip HPV 6/11 olarak saptanmıştır. Bu durum olgu sayımızın sınırlı olması ile açıklanabileceği gibi HPV prevalansı ve HPV tip dağılımının coğrafi farklılıklar göstermesinin bir yansıması da olabilir. Ülkemizde, genel nüfusta ve serviks lezyonlarındaki HPV prevalansını ve tip dağılımını saptamak için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006;24:S3/11-25.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 2009;384(2):260-5.
3. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* 2009;143(2):195-208.
4. Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 2008;107(3):198-217.
5. Milutin Gasperov N, Sabol I, Matovina M, Spaventi S, Grce M. Detection and typing of human papillomaviruses combining different methods: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, line probe assay and sequencing. *Pathol Oncol Res* 2008;14(4):355-63.

6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.
7. Inal MM, Köse S, Yildirim Y, Ozdemir Y, Töz E, Ertopçu K, et al. The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17(6):1266-70.
8. Bozdayı G, Biri A, Rota S. The rapid detection and genotyping of human papillomavirus in genital biopsy specimens by PCR in microbiology laboratory-preliminary study. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst* 2002;12(6):463-5.
9. Husnjak K, Grce M, Magdić L, Pavelić K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* 2000;88(2):125-34.
10. Hobbs CG, Birchall MA. Human papillomavirus infection in the etiology of laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;12(2):88-92.
11. 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.
12. Illades-Aguiar B, Cortés-Malagón EM, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Alarcón-Romero Ldel C, Fernández-Tilapa G, et al. Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors. *Cancer Detect Prev* 2009;32(4):300-7.
13. Sandri MT, Riggio D, Salvatici M, Passerini R, Zorzino L, Boveri S, et al. Typing of human papillomavirus in women with cervical lesions: prevalence and distribution of different genotypes. *J Med Virol* 2009;81(2):271-7.
14. Esmaeili M, Bonyadi M, Dastranj A, Alizadeh M, Melli MS, Shobeiri MJ. HPV typing in women with cervical precancerous and cancerous lesions in north-western Iran. *Gynecol Obstet Invest* 2008;66(1):68-72.
15. De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S. HPV infection in Europe. *Eur J Cancer* 2009;45(15):2632-9.
16. Onan MA, Taskiran C, Bozdayı G, Biri A, Erdem O, Acar A. Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005;26(6):632-5.
17. Ergünay K, Misirlioğlu M, Pinar F, Tuncer ZS, Tuncer S, Ustaçelebi S. [Human papilloma virus DNA in cervical samples with cytological abnormalities and typing of the virus] *Mikrobiyol Bul* 2007;41(2):219-26.
18. Usubütün A, Alemany L, Küçükali T, Ayhan A, Yüce K, de Sanjosé S, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer specimens from Turkey. *Int J Gynecol Pathol* 2009;28(6):541-8.