

SİTOLOJİK OLARAK ANOMALİ SAPTANAN SERVİKS ÖRNEKLERİNDE İNSAN PAPILOMA VİRUS DNA'SININ ARAŞTIRILMASI VE VİRUSUN TİPLENDİRİLMESİ*

INVESTIGATION OF HUMAN PAPILOMA VIRUS DNA IN CERVICAL
SAMPLES WITH CYTOLOGICAL ABNORMALITIES AND
TYPING OF THE VIRUS

**Koray ERGÜNAY¹, Müge MISIRLIOĞLU², Pınar FIRAT³
Z. Selçuk TUNCER⁴, Serdar TUNCER², Şemsettin USTAÇELEBİ¹**

ÖZET: Tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturan insan papilloma virusları (HPV)'nin belirli tiplerinin servikal kanser gelişimde etkili olduğu bilinmektedir. Servikal kanserin erken teşhisi ve önlenmesinde, kişideki HPV enfeksiyonunun ve etken olan tipin saptanması önem taşımaktadır. Bu çalışma, ülkemizde sitolojik atipi izlenen servikal örneklerde enfeksiyon etkeni olan HPV tiplerinin belirlenmesi amacıyla bir ön araştırma olarak planlanmıştır. Çalışmaya, ticari sıvı bazlı sitoloji sistemleri ile değerlendirilen 35 servikal sürüntü örneği dahil edilmiştir. HPV DNA'sının saptanması için, viral genomda L1 bölgesini hedefleyen MY09/11 ve GP5/6 konsensus primerleri kullanılarak "nested" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi uygulanmış, tiplendirme PCR ürünlerinin DNA dizi analizi ile yapılmıştır. Örneklerin 14'ünde ASC-US (Aypical squamous cells of undetermined significance), üçünde ASC-H (Atypical squamous cells-cannot exclude HSIL), beşinde HSIL (High-grade intraepithelial lesion), yedisinde LSIL (Low-grade intraepithelial lesion), dördünde LSIL+şüpheli HSIL, birinde AG-US (Aypical glandular cells of undetermined significance) birinde ise doğası belirsiz atipik hücreler saptanmıştır. Çalışmamızda, 35 örneğin 28'inde (%80) HPV-DNA pozitifliği tespit edilmiş, ASC-US ve ASC-H olgularından oluşan yedi kişide (%20) pozitiflik belirlenmemiştir. Yapılan dizi analizi sonunda, örneklerin %78.6'sında (22/28) yüksek riskli HPV tipleri (tip 16, 18, 31, 33, 45, 56, 59), %7.1'inde (2/28) muhtemel yüksek riskli tipler (tip 53) ve %14.3'ünde (4/28) düşük riskli tipler (tip 6, 54, 72, 81) tanımlanmıştır. HPV tip 16, örneklerin %50'sinde saptanarak en sık izlenen tip olmuş, onu örneklerin %10.7'sinde (3/28) saptanan tip 18 ve %7.1'inde (2/28) saptanan tip 53 takip etmiştir. Sonuç olarak çalışmamız, görece olarak az sayıda da olsa, incelenen servikal örneklerde HPV tiplerinin dağılımı ile ilgili ön verileri ortaya koymakla birlikte, ülkemizde HPV enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin aydınlatılması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: İnsan papilloma virusu, tiplendirme, servikal, sitoloji.

*Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 05 A 101 015).

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (ekoray@hacettepe.edu.tr)

² Metis Biyoteknoloji ve Dış Tic. Ltd. Şti. ATB İş Merkezi, Anadolu Bulvarı, Ankara.

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Sitoloji Ünitesi, Ankara.

⁴ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Ankara.

ABSTRACT: Human Papillomavirus (HPV) infections and cervical carcinoma which is associated with certain types of the virus have been worldwide public health issue. Early diagnosis of HPV infections and the detection of viral genotypes are important for the successful treatment and prevention of cervical carcinoma. This study has been designed as a preliminary study to estimate HPV type distribution in cervical samples with cytologic abnormalities in our country. A total of 35 cervical samples which were evaluated by a commercial liquid-based cytological system, were included to the study. The presence of HPV-DNA has been searched with nested polymerase chain reaction (PCR) by using consensus primer sets of MY09/11 and GP5/6 that target L1 region of the viral genome. HPV typing was performed by direct sequencing of the amplicons. In cytologic evaluation, 14 samples were diagnosed as ASC-US (Atypical squamous cells of undetermined significance), three were ASC-H (Atypical squamous cells-cannot exclude HSIL), five were HSIL (High-grade intraepithelial lesion), seven were LSIL (Low-grade intraepithelial lesion), four were LSIL+suspected HSIL, one was AG-US (Atypical glandular cells of undetermined significance) and one was atypical cells of undefined nature. HPV-DNA was detected in 28 of the 35 (80%) samples, and sequence analysis revealed high-risk HPV types (type 16, 18, 31, 33, 45, 56, 59) in 22 (78.6%) samples, probable high-risk types (type 53) in two (7.1%) samples and low-risk types (type 6, 54, 72, 81) in four (14.3%) samples. HPV type 16 emerged as the most frequently-detected type, comprising 50% (14/18) of all samples; followed by type 18 in 10.7% (3/28) and type 53 in 7.1% (2/28) of the samples. As a result, although the number of cervical samples were relatively low, the preliminary data obtained with this study revealed the HPV type distribution, however more detailed studies are needed to elucidate the epidemiology of HPV infections in Turkey.

Key words: Human papilloma virus, typing, cervical, cytology.

GİRİŞ

İnsan papilloma virusuna (Human Papilloma Virus; HPV) bağlı olarak ortaya çıkan genital enfeksiyonlar, her iki cinsiyet için tüm dünyada en sık izlenen cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlardandır¹. HPV'nun, kadınlarda servikal kanser gelişimi ile ilişkisi günümüzde net olarak ortaya konulmuştur². Serviks kanseri tüm dünyada kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ikinci sırayı alır, gelişmekte olan ülkelerde ise en sık ortaya çıkan kanserdir. Dolayısıyla servikal kanserin erken tanısında, rutin servikal sitoloji ile prekanseröz değişikliklerin, belirli endikasyonlarda da HPV'nun saptanması büyük önem taşımaktadır³.

HPV virionları zarfsız olup, ikozahedral kapside sahiptir ve yaklaşık 7900 baz çiftinden oluşan çembersel DNA genomu içerir⁴. Önceden *Papovaviridae* ailesinde Polyomaviruslarla birlikte sınıflandırılan Papillomaviruslar, artık *Papillomaviridae* olarak ayrı bir ailede incelenmektedir⁵. Viral genomun yaklaşık %10'luk bölümü kontrol bölgelerini içermekte, geri kalan kısmı ise erken (early, E) ve geç (late, L) proteinleri kodlamaktadır⁴. Günümüzde 200'ü aşkın HPV tipinin varlığına ilişkin kanıtlar bulunmakta ve bunlar genel olarak doku tropizmine göre (mukozal, dermal, vb.) gruplandırılmaktadır. HPV tiplerinin bazıları iyi huylu lezyonlarda saptanmakta (düşük riskli/onkojenik olmayan tipler), bazıları ise kanser dokularından izole edilerek yüksek riskli/onkojenik tipler olarak adlandırılmaktadır⁶. Buna göre mukozal lezyonlarda sık rastlanan

HPV tiplerinden tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82 yüksek riskli; tip 26, 53 ve 66 muhtemel yüksek riskli; tip 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 ve 81 ise düşük riskli olarak tanımlanmaktadır⁷.

Ülkemizde HPV prevalansı ve tip dağılımı ile ilgili çalışmalar sınırlı kapsam ve sayıdadır⁹⁻¹⁰. Günümüzde yüksek riskli belirli HPV tiplerine karşı koruma sağlayabilen aşularının geliştirilmesi ve ülkemiz de aralarında olmak üzere birçok ülkede kullanım lisansı almış olmaları; bölgesel tip dağılımı verilerinin önemini artırmıştır¹¹⁻¹³. Bu çalışmada, sitolojik anomali izlenen servikal örneklerde, standardize ve yüksek duyarlılığa sahip yöntemler kullanılarak HPV-DNA saptanması ve virusun tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve Örnekler: Çalışmaya, 2006 yılında Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve rutin sitolojik incelemesinde atipi saptanan olgulardan randomize olarak seçilen 35 kişi dahil edildi. Olguların yaş aralığı 27-71 yıl ve yaş ortalaması 43.6 yıl idi. Aynı kişiye ait tekrarlayan örnekler çalışma dışında bırakıldı. Çalışma Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar No. 05/22-15).

Sitolojik İnceleme: Bu amaçla, moleküler çalışmalar için uygun olduğu bildirilen¹⁴ FDA onaylı ticari sıvı bazlı bir sitolojik yöntem (ThinPrep™ Pap Smear Method, Cytyc, USA) kullanıldı. Değerlendirme, uzman sitolog tarafından yapıldı ve tanımlamada modifiye Bethesda sistemi kullanıldı¹⁵. Örnekler, spatula ve endoservikal fırça kullanılarak kadın hastalıkları ve doğum uzmanı tarafından alındı. Elde edilen hücreler sisteme ait koruyucu solüsyonda laboratuvara ulaştırıldı ve yine sisteme ait ekipman kullanılarak önerildiği şekilde yoğunlaştırılarak sitolojik inceleme için lama aktarıldı. Artan kısım ise nükleik asit saflaştırması için kullanıldı.

HPV-DNA Saptanması: Nükleik asit saflaştırması için, serviksten elde edilen hücreler 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, Tris-EDTA ile 3 kez yıkandı ve 200 µl Tris-EDTA içerisinde tekrar süspanse edilerek "High Pure Viral Nucleic Acid Kit™" (Roche Diagnostics, Almanya) ile üreticinin önerileri doğrultusunda işleme alındı. Saflaştırılan örneklerde viral nükleik asitlerin saptanması amacıyla L1 kapsid genini hedefleyen MY09/11 ve GP5/6 primerlerinin kullanıldığı konsensus "nested" PCR yöntemi uygulandı¹⁶⁻¹⁸. Saflaştırılan DNA örneğinden 5 µl, PCR tamponu (50 mM KCl, 10 Mm Tris-HCl, pH: 8.3), 6.5 mM MgCl₂, her deoksiribonükleotitten 200 µM, 50 pm MY09 ve MY11 primerleri ve 2 ünite Taq DNA polimeraz eklenerek 50 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı PTC-200 "Gradient Thermal Cycler" kullanılarak (MJ Research, USA), 94°C'de 5 dak. denatürasyon, 94°C'de 20 sn, 55°C'de 45 sn, 72°C'de 60 sn'lik 35 döngü amplifikasyon, 72°C'de 5 dak. sentez basamaklarından oluşan protokol ile amplifiye edildi. Ürünlerin 10 µl'si %2'lik agaroz jelde elektroforez işlemine alındıktan sonra etidyum bromür ile boyandı ve ultraviyole transillüminatöründe yaklaşık 450 baz çift (bc)'lik ürünler incelendi. İkinci tur PCR için, ilk reaksiyon ürünlerinden 5 µl, PCR tamponu (50 mM KCl, 10 Mm

Tris-HCl, pH: 8.3), 2.5 mM MgCl₂, her deoksiribonükleotitten 200 µM, 50 pm GP5 ve GP6 primerleri ve 2 ünite Taq DNA polimeraz eklenerek 50 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı PTC-200 "Thermal Cycler" (MJ Research, USA) ile aynı sıcaklık döngüsü protokolü ile amplifiye edildi. İkinci reaksiyonun ürünleri de %2'lik agaroz jelde elektroforez işlemine alındıktan sonra etidyum bromür ile boyandı ve yaklaşık 142 bç'lik ürünlerin varlığı açısından ultraviyole transillüminatöründe incelendi. Çalışmada hücre başına 1-2 HPV-16 genom kopyası içeren SiHa hücreleri pozitif kontrol olarak, steril distile su ve HPV DNA'sı taşımayan sitoloji örnekleri negatif kontrol olarak amplifikasyon işlemine dahil edildi. Nükleik asit saflaştırması, PCR ve elektroforez kontaminasyonunun önlenmesi için farklı laboratuvarlarda yapıldı. Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo I'de gösterildi.

Tablo I. Çalışmada HPV saptanması için uygulanan nested PCR kapsamında kullanılan oligonükleotid primerler ve viral genomdaki yerleşimleri

Primer	Dizi (5'-3')*	Ürünün Yerleşimi	Ürün (baz çifti)
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	6772-7170	~ 450
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	(HPV tip 6)	
GP5	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	6764-6902	~ 140
GP6	GAAAATAAACTGTAAATCA	(HPV tip 6)	

*M: A+C, R: A+G, W: A+T, Y: C+T.

HPV Tiplerinin Saptanması: HPV izolatlarının tiplendirmesi direk dizi analizi ile yapıldı. Bunun için ilk turda pozitif olarak saptanan örneklerden MY09/11, ikinci tur reaksiyon sonucu ampikonlar saptanan örneklerden ise GP5/6 primerleri ile Cy5.5 "dye terminator cycle sequencing kit" (Amersham Biosciences, UK) kullanılarak PTC-200 "Gradient Thermal Cycler" (MJ Research, USA) ile reaksiyona alındı. Dizi analizi reaksiyonu öncesi gerektiğinde PCR ürünleri "High Pure PCR Product Purification Kit™" (Roche Diagnostics, Germany) ile temizlendi. Dizi reaksiyonu ürünleri amonyum asetat ile presipite edildikten sonra "Open Gene System Long Read Tower" (Visible Genetics, Canada) sisteminin %6'lık akrilamid karışımı içeren hazır cam kasetlerine yüklendi ve üreticinin önerileri doğrultusunda yürütme işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen ham veriler gen bankası verileri ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen olguların sitolojik incelemesi sonucunda; 14'ünde ASC-US (Aypical squamous cells of undetermined significance), 3'ünde ASC-H (Atypical squamous cells-cannot exclude HSIL), 5'inde HSIL (High-grade intraepithelial lesion), 7'sinde LSIL (Low-grade intraepithelial lesion), 4'ünde LSIL+şüpheli HSIL, birinde AG-US (Aypical glandular cells of undetermined significance) ve birinde doğası belirsiz atipik hücreler saptanmıştır.

PCR sonunda, çalışmaya alınan 35 örneğin 28'inde (%80) HPV-DNA pozitifliği belirlenmiş, 7 örnek ise negatif sonuç vermiştir. HPV-DNA negatif örneklerin 6'sının ASC-US ve birinin ASC-H tanısı aldığı görülmüştür. Tiplendirme

sonucunda; 28 örneğin 22'sinde (%78.6) yüksek riskli (tip 16, 18, 31, 33, 45, 56,59), 2'sinde (%7.1) muhtemel yüksek riskli (tip 53), 4'ünde (%14.3) ise düşük riskli (tip 6, 54, 72, 81) HPV tipleri tanımlanmıştır (Tablo II). En sık rastlanılan HPV tipinin, tip 16 (14/28, %50) olduğu, bunu tip 18 (3/28, %10.7) ve tip 53'ün (2/28, %7.1) izlediği görülmüştür.

İncelenen LSIL örneklerinde 7, ASC-US örneklerinde 4, HSIL örneklerinde 3, LSIL+şüpheli HSIL örneklerinde 3 farklı tip, diğer örneklerde ise birer HPV tipi saptanmıştır. HSIL örneklerinde saptanan tüm tipler yüksek riskli ya da muhtemel yüksek riskli olarak gruplandırılırken, birden fazla tip saptanan diğer sitolojik tanı gruplarında yüksek ve düşük riskli tipler birlikte izlenmiştir (Tablo II).

Tablo II. HPV-DNA Pozitifliği ve HPV Tiplerinin Örneklerin Sitolojik Tanılarına Göre Dağılımı

Sitolojik Tanı* (Sayı)	HPV-DNA Pozitif Sayı	Yüksek/Muhtemel Yüksek Risk (Sayı)	Düşük Risk (Sayı)
ASC-US (14)	8	Tip 16 (4), tip 18 (2), tip 59 (1)	Tip 54 (1)
ASC-H (3)	2	Tip 16 (2)	-
HSIL (5)	5	Tip 16 (3), tip 45 (1), tip 53 (1)	-
LSIL (7)	7	Tip 16 (2), tip 18 (1), tip 33 (1), tip 56 (1)	Tip 6 (1), tip 81 (1)
LSIL+?HSIL (4)	4	Tip 16 (2), tip 53 (1)	Tip 72 (1)
AG-US (1)	1	Tip 16 (1)	-
Atipi (1)	1	Tip 31 (1)	-
Toplam (35)	28		

* ASC-US: Aypical squamous cells of undetermined significance, ASC-H: Atypical squamous cells-cannot exclude HSIL, HSIL: High-grade intraepithelial lesion, LSIL: Low-grade intraepithelial lesion, AG-US: Aypical glandular cells of undetermined significance.

TARTIŞMA

Serviks kanseri açısından risk taşıyan kişilerin belirlenmesi ve uygun klinik takibin gerçekleştirilmesi için, rutin sitolojik taramalara ek olarak HPV enfeksiyonunun ve virus tipinin saptanması yaklaşımı tüm dünyada yaygın olarak uygulanmaktadır^{1,3}. HPV enfeksiyonlarının tanısında virus izolasyonu ya da serolojik testlerin yararlı olmaması nedeniyle viral nükleik asitlerin gösterilmesi en geçerli yaklaşımdır¹⁹.

HPV enfeksiyonlarının saptanması amacıyla L1 ya da E1 bölgesini hedefleyen konsensus PCR, kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çeşitli sinyal amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır¹⁹. Virus tiplerinin belirlenmesi için de, restriksiyon enzim analizi, tipe özgül PCR, mikroyet ya da strip hibridizasyon veya dizi analizi yöntemleri uygulanabilmektedir¹⁹. Bizim çalışmamızda servikal sürüntü örneklerde, diğer konsensus PCR yöntemlerine göre daha yüksek

duyarlılığa sahip olduğu bilinen, ayrıca düşük viral genom kopya sayısına sahip olan örneklerde saptama avantajı taşıdığı gösterilmiş bir konsensus “nested” PCR yöntemi uygulanmıştır^{16,20}. Virus tiplerinin saptanmasında da, bilinen, nadir izlenen ya da yeni tüm tipleri saptama imkanına sahip DNA dizi analizi yöntemi tercih edilmiştir²¹.

Çalışmada incelenen 35 örneğin 28’inde (%80) HPV-DNA varlığı saptanmış, 7’si (%20) ise negatif olarak izlenmiştir. Bu yüksek pozitiflik oranının, sitolojik atipi saptanan olguların çalışmaya alınmasından ve kullanılan yöntemin yüksek duyarlılığa sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Benzer çalışma gruplarında, bu yöntemle örneklerde %84.2 oranında pozitiflik saptandığı ve yöntemin tek oturumlu konsensus PCR’a göre pozitiflik oranını belirgin olarak artırdığı rapor edilmiştir^{16,20}.

HPV-DNA pozitif bulunan 28 örnekte virus tiplendirmesi sonunda; 22’sinde (%78.6) yüksek riskli, ikisinde (%7.1) muhtemel yüksek riskli ve dördünde (%14.3) düşük riskli HPV tipleri tanımlanmıştır. En sık rastlanan HPV tipi, örneklerin 14’ünde (%50) pozitif olan tip 16’dır. Bunu, %10.7 (3/28) oranı ile tip 18, %7.1 (2/28) oranı ile tip 53 ve birer (%3.5) örnekte saptanan tip 31, 33, 45, 56, 59, 6, 54, 72 ve 81 izlemiştir. HSIL tanılı örneklerde saptanan tüm tipler yüksek riskli ya da muhtemel yüksek riskli tipler olurken, daha düşük düzeyde hücresel atipi izlenen örneklerde düşük riskli tiplerin varlığı da gösterilmiştir.

Normal serviks ya da çeşitli sitolojik anomaliler bulunan örneklerde saptanan HPV tipleri ve epidemiyolojik özellikleri, çeşitli metaanalizlerde değerlendirilmiştir^{13,22,23}. HPV tip 16 ve 18 servikal kanser olgularında tüm dünyada en sık rastlanan tipler olarak saptanmakta, ancak bunların dışında kalan tiplerin dağılımında bölgeler arası değişiklikler izlenmektedir¹³. Sitolojik olarak normal olgularda, çeşitli bölgeler arasında saptanan bir diğer farklılık da tip 16 ‘nın 16-dışı tiplere oranıdır. Buna göre Avrupa ülkelerinde tip 16 daha sık izlenirken, Sahra altı Afrika’da daha düşük oranda görülmekte, Güney Amerika’da ise orta düzeylerde bulunmaktadır. Kuzey Amerika’daki dağılımın ise Avrupa’dakine benzer olduğu düşünülmektedir²⁴. HSIL olgularında saptanan HPV tipleri ise, azalan prevalansa göre tip 16, 31, 58, 18, 33, 52, 35, 51, 56, 45, 39, 66 ve 6 şeklindedir^{13,23}. Bu sıralamanın servikal kanser olgularında saptanan HPV tiplerinden farkı, tip 18’in oranının göreceli olarak düşük olması ve tip 45’in daha nadiren saptanmasıdır¹³. HSIL olgularında HPV tiplerinin bölgesel dağılımı incelendiğinde, tüm ülkelerde tip 16’nın en sık izlenen tip olduğu, ancak Asya’da %34 olan saptanma sıklığının Avrupa ülkelerinde %52’ye kadar yükseldiği görülmektedir. LSIL olgularında da benzer şekilde tip 16’ya en sık rastlanmakta, tip 31, 51, 53, 56, 52, 18, 66 ve 58 de değişen sıklıklarda tanımlanmaktadır²⁵. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bu verilere paralellik göstermektedir. Tip 16, LSIL dışında tüm farklı sitolojik atipilerde en sık rastlanılan HPV tipi olmuş, LSIL örneklerinde de yüksek ve düşük riskli tipler olan tip 16, 18, 33, 56 ve 6 bulunmuştur. İncelediğimiz HSIL olgularında da, tip 18 dışında yüksek/muhtemel yüksek riskli tipler olarak tip 16, 45 ve 53 gösterilmiştir. Ek olarak çalışmamızda, sık rastlanılan tipler olmayan düşük riskli HPV tip 72 ve 81’in varlığı da tanımlanmıştır.

Ülkemizde servikal patolojilerde HPV prevalansı ve/veya tip dağılımı ile ilgili çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Özçelik ve arkadaşları⁹, "Hybrid Capture" sistemini (Digene, USA) kullanarak, serviks kanseri için düşük risk taşıyan hasta grubunda HPV DNA'sını %6.1 oranında saptamışlardır. Bu yöntemin kullanıldığı diğer bir çalışmada ise, normal servikal sitoloji örneklerinde %2.1, epitelyal hücre anomalisi izlenen örneklerde ise %42.9 oranında HPV DNA'sı gösterilmiştir¹⁰. Tuncer ve arkadaşlarının çalışmasında ise, yine Hybrid Capture sistemi ile rutin kontrol hastalarının %4'ünde HPV-DNA pozitifliği bulunmuştur (Yayınlanmamış bilgi). Hybrid Capture sistemi özellikle yüksek örnek sayılarında kolayca çalışılabilen bir sistem olmasına karşın, kullanılan prob kokteyllerinin sadece belirli yüksek ve/veya düşük riskli HPV tiplerini saptaması, dolayısıyla kesin tiplendirme yapamaması ve duyarlılığının PCR testlerine göre düşük olması gibi dezavantajlara sahiptir¹⁹. Bir başka çalışmada da, MY09/11 konsensus PCR ile rutin muayene için kliniğe başvuran hastalarda %2.7 oranında HPV-DNA varlığı saptanmıştır (Yayınlanmamış bilgi).

Ülkemizdeki HPV tiplerine ait veriler sıklıkla onkojenik tipleri hedefleyen primerlerle yapılan çalışmalardan gelmektedir. Tuncer ve arkadaşları²⁶, tipe özgül primerler kullanılarak uyguladıkları PCR ile normal, displazi ve invazif karsinom tanısı almış servikal biyopsi örneklerinin %37.8'inde HPV tip 16, %9.2'sinde ise HPV tip 18 genomu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada ise, lezyondaki atipi yoğunluğu ile HPV saptanması arasında korelasyon bulunmuş ve tip 16 ile 18'in viral yükleri belirlenmiştir⁸. İncelenen örneklerin görece olarak az olmasına karşın bizim çalışmamız, yüksek duyarlılığa sahip bir saptama sisteminin kullanılması ve tiplendirme için altın standart kabul edilen DNA dizi analizinin uygulanmış olması gibi avantajları ile, HPV tip dağılımı ile ilgili önemli ön verileri ortaya koymaktadır. Ancak ülkemizde HPV enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin ve HPV tip dağılımının aydınlatılması için daha fazla sayıda örneğin incelendiği kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Can Med Assoc J* 2001; 164: 1017-25.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-50.
3. Cronje HS. Screening for cervical cancer in developing countries. *Int J Gynecol Oncol* 2004; 84: 101-8.
4. Chow LT, Broker TR. Papillomavirus DNA replication. *Intervirolgy* 1994; 37: 143-9.
5. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005; 32(S): 1-6.
6. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
7. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
8. Onan MA, Taşkıran C, Bozdayı G, et al. Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26: 632-5.

9. Özçelik B, Serin IS, Gökahmetoğlu S, Başbuğ M, Erez R. Human papillomavirus frequency of women at low risk of developing cervical cancer: a preliminary study from a Turkish university hospital. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24: 157-9.
10. Öztürk S, Kaleli I, Kaleli B, Bir F. Investigation of human papillomavirus DNA in cervical specimens by hybrid capture assay. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38: 223-32.
11. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Rev Med Virol* 2006; 16: 139-49.
12. Baseman JG, Kautsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32S: S16-24.
13. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24(S3): 26-34.
14. Sherman ME, Schiffman MH, Lorincz AT, et al. Cervical specimens collected in liquid buffer are suitable for both cytologic screening and ancillary human papillomavirus testing. *Cancer* 1997; 81: 89-97.
15. 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: 2114-9.
16. Evander M, Edlund K, Boden E, et al. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 987-92.
17. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-14.
18. 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: 173-81.
19. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 43-51.
20. Husnjac K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* 2000; 88: 125-34.
21. Vernon SD, Unger ER, Williams D. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting and hybrid capture. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 651-5.
22. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88: 63-73.
23. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89: 101-5.
24. Brown DR, Legge D, Qadadri B. Distribution of human papillomavirus types in cervicovaginal washings from women evaluated in a sexually transmitted diseases clinic. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 763-8.
25. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1157-64.
26. Tuncer S, Ustaçelebi Ş. Servikal biyopsi örneklerinde insan papillomavirusları tip 16 ve 18'in polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Flora* 1996; 1: 40-44.