

ÖZGÜN ÇALIŞMA
SİTOLOJİK ATİPİ İZLENEN SERVİKAL ÖRNEKLERDE İNSAN
PAPİLLOMA VİRUSUNUN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU VE
HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİYLE SAPTANMASI VE TİPLENDİRİLMESİ*

ORIGINAL ARTICLE

DETECTION AND TYPING OF HUMAN *PAPILLOMA* VIRUS BY
POLYMERASE CHAIN REACTION AND HYBRIDIZATION ASSAY IN
CERVICAL SAMPLES WITH CYTOLOGICAL ABNORMALITIES

Koray ERGÜNAY¹, Müge MISIRLIOĞLU², Pınar FIRAT³

Z. Selçuk TUNCER⁴, Serdar TUNCER², Işıl YILDIZ³

Şemsettin USTAÇELEBİ¹

ÖZET: Mukozal tropizm gösteren insan *papilloma* viruslarının (HPV) bazı tiplerinin servikal karsinom ya da öncül lezyonları ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Serviks kanserinin erken tanı ve tedavisinde, tarama programlarına ek olarak HPV enfeksiyonunun ve etken virus tipinin duyarlı yöntemlerle saptanması da önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, servikal atipi saptanan sitoloji örneklerinde tek oturumlu ve “nested” konsensus polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri uygulanarak HPV varlığının araştırılması, tiplendirilmesi ve HPV tip 16’nın saptanmasında ticari bir gerçek zamanlı (real-time) PCR yöntemi ile ticari bir array-hibridizasyon sisteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya ticari bir sıvı bazlı sitolojik örnekleme sistemi (ThinPrep™ Pap Smear Method, Cytyc, ABD) ile elde edilen 18 ASC-US (Aypical Squamous Cells of Undetermined Significance), dört AG-US (Aypical Glandular cells of Undetermined Significance), bir ASC-H (Atypical Squamous Cells-cannot exclude HSIL), bir HSIL (High-grade Intraepithelial Lesion), 14 LSIL (Low-grade Intraepithelial Lesion), bir adenokarsinom ve bir skuamoz hücreli karsinom olmak üzere, rastgele olarak seçilmiş toplam 40 örnek dahil edilmiştir. HPV DNA’sının saptanması için MY09/11 ve GP5/6 primerlerinin kullanıldığı L1 “in-house” konsensus PCR; HPV saptama/HPV-16 tiplendirmesi yapan ticari bir gerçek zamanlı (real-time) PCR sistemi (Heliosis™ HPV LC PCR Kit; Metis Biyoteknoloji, Türkiye) ve düşük/yüksek riskli 21 farklı virus tipinin tanımlanabildiği ticari bir PCR-array hibridizasyon sistemi (Rapid HPV Genotyping MacroArray™; HybriBio Inc, Hong Kong) uygulanmıştır. Virusa ait DNA, MY09/11 ve GP5/6 primerleri ile, örneklerin sırasıyla %35 (14/40) ve %57.5’inde (23/40) saptanmış, konsensus PCR ile pozitif olan örnekler gerçek zamanlı PCR ile de pozitif

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

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, Macunköy, Ankara.

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

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

sonuç vermiştir. PCR-array hibridizasyon yöntemi ile pozitif örneklerin %95.6'sında (22/23) tiplendirme yapılmış, konsensus PCR ve gerçek zamanlı PCR sonucu pozitif bir LSIL örneği, uygulanan herhangi bir yöntemle tiplendirilememiştir. Örneklerden yüksek riskli HPV tipleri 16, 18, 31, 45, 52, 56, 58, 59, 68 (%65.8); muhtemel yüksek riskli tip 53 (%13.2), düşük riskli tipler 6, 42 ve 81 (%21) olmak üzere 38 HPV izolati tanımlanmıştır. Birden fazla HPV tipi ile çoklu enfeksiyon, pozitif örneklerin %45.5 (10/22)'inde saptanmış, tekli enfeksiyonların tamamının yüksek/muhtemel yüksek riskli HPV izolatlari ile meydana geldiği ve düşük riskli tiplerin sadece çoklu enfeksiyonlarda bulunduğu izlenmiştir. HPV-16, pozitif örneklerin %31.8 (7/22)'ünde gerçek zamanlı PCR, %45.5 (10/22)'inde ise PCR-array hibridizasyon testiyle gösterilmiştir. Çalışmada en sık saptanan tip %45.5 oranıyla HPV-16 olmuş, onu tip 53 ve tip 81 (%22.7, 5/22); tip 68 (4/22, %18.2); tip 58 (3/22, %13.6); tip 31, 42, ve 59 (%9.1, 2/22) ve diğer tipler (%4.5, 1/22) izlemiştir. Sonuç olarak bulgularımız, yüksek riskli HPV tiplerinin ve çoklu enfeksiyonların sıklığına dikkati çekmektedir.

Anahtar sözcükler: İnsan papilloma virusu, HPV, tiplendirme, polimeraz zincir reaksiyonu, PCR, gerçek zamanlı PCR, array, hibridizasyon.

ABSTRACT: Certain mucosa-tropic human papillomavirus (HPV) types are associated with carcinoma of the uterine cervix or its precursor lesions. In addition to cytological screening, early diagnosis and treatment of cervical carcinoma rely on sensitive detection and typing of HPV isolates. In this study, HPV detection and typing were performed in the cervical samples of patients with abnormal cytological evaluation. Forty randomly-selected cervical samples that comprise 18 ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance), four AG-US (Atypical Glandular cells of Undetermined Significance), one ASC-H (Atypical Squamous Cells-can not exclude HSIL), one HSIL (High-grade Intraepithelial Lesion), 14 LSIL (Low-grade Intraepithelial Lesion), one adenocarcinoma and one squamous cell carcinoma, obtained by a commercial liquid-based cytology system (ThinPrep™ Pap Smear Method, Cytoc, USA), were included to the study. HPV-DNA detection were accomplished by L1 in-house polymerase chain reaction (PCR) performed using MY09/11 and GP5/6 primers along with a commercial real-time PCR (Heliosis™ HPV LC PCR Kit; Metis Biotechnology, Turkey) that detects HPV infections and HPV-16 via melting curve analysis. A commercial PCR-array hybridization test (Rapid HPV Genotyping MacroArray™; HybriBio Inc, Hong Kong) that can identify 21 low and high risk HPV types was employed for typing. Viral DNA was detected in 35% (14/40) and 57.5% (23/40) of the samples by MY09/11 and GP5/6 primers, respectively. All in-house PCR positive samples were also positive in the real-time PCR assay. PCR-array hybridization assay provided typing results in 95.6% (22/23) of the PCR positive samples while one LSIL sample could not be typed by any of the methods used. High risk HPV types 16, 18, 31, 45, 52, 56, 58, 59, 68 (65.8%); probable high risk type 53 (13.2%), low risk types 6, 42 and 81 (21%) were identified out of a total of 38 HPV isolates. Multiple infections with more than one HPV type were identified in 45.5% (10/22) of positive samples. High/probable high risk types were detected in all single infections and all low risk isolates were present in multiple infections. HPV-16 was identified in 31.8% (7/22) by real-time PCR and in 45.5% (10/23) of positive samples by PCR-array hybridization assay. HPV-16 was observed to be the most frequently detected type (10/22, 45.5%), followed by types 53 and 81 (5/22, 22.7%); 68 (4/22, 18.2%); type 58 (3/22; 13.6%); types 31, 42 and 59 (2/22; 9.1%) and others (1/22, 4.5%). As a result our data have indicated the abundance of high risk HPV isolates and infections with multiple HPV types in that specific area.

Key words: Human papilloma virus, HPV, typing, polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, array, hybridization.

GİRİŞ

İnsan *papilloma* virusu (HPV), *Papillomaviridae* ailesinde sınıflandırılan zarfsız, çift iplikli bir DNA virusudur¹. Günümüzde doku tropizmi, onkojenik potansiyel ve filogenetik farklılıklara göre 100'ü aşkın sayıda HPV tipi tanımlanmıştır². Doku tropizmi ve enfeksiyon bölgesine göre kütanöz (deri) ya da mukozal (anogenital/oral) olarak sınıflandırılabilen HPV izolatları, servikal karsinoma ya da bununla ilişkili öncül lezyonlarla olan etyolojik ilişkilerine göre yüksek riskli (tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82); muhtemel yüksek riskli (tip 26, 53 ve 66) ve düşük riskli (tip 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 ve 81) olarak tanımlanmaktadır³. Yüksek riskli HPV tipleri olan tip 16 ve 18, tüm dünyada en sık saptanan tiplerdir. Özellikle HPV aşılarının geliştirilmesi ve kullanıma sunulması ile bölgesel olarak yüksek riskli HPV tiplerinin dağılımının ortaya çıkarılması, hem aşı etkinliğinin öngörülmesi hem de gelecekteki çalışmalarda dikkate alınması gereken HPV tiplerinin belirlenebilmesi açısından önem taşımaktadır⁴⁻⁶. Bu çalışmada, servikal atipi saptanan sitoloji örneklerinde tek oturumlu ve "nested" konsensus polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri uygulanarak HPV varlığının araştırılması ve HPV tip 16'nın saptanmasında ticari bir gerçek zamanlı (real-time) PCR yöntemi ile ticari bir array-hibridizasyon sisteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örnekler ve Nükleik Asit Saflaştırması: Çalışmaya, 2006 yılında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve rutin sitolojik incelemesinde atipi saptanan olgulardan 40'ı rastgele olarak seçilerek dahil edildi. Yerel etik kurul onayı (Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu; Karar No. 05/22-15) ve bilgilendirilmiş onam örnekleme sırasında alındı. İncelenen olguların yaş ortalaması 44.5, ortanca değeri 43 ve dağılım aralığı 30-61 olarak belirlendi. Sitolojik inceleme, modifiye Bethesda sistemine⁷ göre yapıldı, aynı hastaya ait tekrarlayan örnekler çalışma dışı bırakıldı.

Çalışma için servikal örnekler rutin sitolojik tanı amacıyla kullanılan, FDA onaylı ve nükleik asit testleri çalışması için uygun ticari bir sıvı bazlı inceleme sistemi (ThinPrep™ Pap Smear Method, Cytoc, ABD) ile üreticinin önerileri doğrultusunda alındı ve laboratuvara ulaştırıldı⁸. Çalışmaya dahil edilen olgularda sitolojik inceleme sonucunda; 18'inde ASC-US (Aypical Squamous Cells of Undetermined Uignificance), 4'ünde AG-US (Aypical Glandular cells of Undetermined Significance), 1'inde ASC-H (Atypical Squamous Cells-cannot exclude HSIL), 1'inde HSIL (High-grade Intraepithelial Lesion), 14'ünde LSIL (Low-grade Intraepithelial Lesion), 1'inde adenokarsinom ve 1'inde skuamoz hücreli karsinom tanımlanmıştı.

Sitolojik inceleme sonrasında servikal sürüntü örnekleri 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler Tris-EDTA ile 3 kez yıkandı, 200 µl Tris-EDTA içerisinde tekrar süspanse edilen örneklerde nükleik asit saflaştırması High Pure Viral Nucleic Acid Kit™ (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda yapıldı.

HPV L1 Konsensus PCR: Safılaştırılan örneklerde viral nükleik asitlerin saptanması amacıyla L1 kapsid genini hedefleyen MY09/11 ve GP5/6 primerleri kullanılarak "in house" PCR yöntemi uygulandı⁹⁻¹¹. İlk PCR karışımı; 5 µl DNA örneği, PCR tamponu (50 mM KCl, 10 Mm Tris-HCl (pH 8.3)), 6.5 mM MgCl₂, 200 µM deoksiribonükleotidler, 50'şer pm MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC 3') ve MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') primerleri ve 2 ünite Taq DNA polimeraz içerecek şekilde, 50 µl'lik toplam hacimde hazırlandı (M: A+C, R: A+G, W: A+T, Y: C+T). Karışıma 5 dakika 94°C'de denatürasyon; 20 saniye 94°C'de, 45 saniye 55°C'de, 60 saniye 72°C'de olacak şekilde toplam 35 döngü amplifikasyon ve 72°C'de 5 dakika sentez aşamasından oluşan sıcaklık döngüleri uygulandı. İkinci tur PCR için ilk reaksiyon ürünlerinden 5 µl, 2.5 mM MgCl₂, 50 pm GP5 (5'-TTTGTACTGTGGTAGATAC-3') ve GP6 (5'-GAAAAATAAACTGTAAATCA-3') primerleri; diğer kimyasallardan aynı miktarlarda içeren 50 µl'lik karışım hazırlandı ve aynı sıcaklık döngüleri ile amplifiye edildi. Tüm PCR sıcaklık döngüleri PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, ABD) kullanılarak uygulandı. Her PCR sonrasında ürünlerin 10 µl'si %2'lik agaroz jelde elektroforez işlemine alındıktan sonra etidyum bromür ile boyandı ve ultraviyole transillüminatöründe MY09/11 için yaklaşık 450, GP5/6 için yaklaşık 142 baz çiftlik amplikonların varlığı araştırıldı. Konsensus PCR için pozitif kontrol olarak hücre başına sırasıyla 1-2 ve 600 HPV-16 genom kopyası içeren SiHa ve Caski hücreleri kullanıldı; negatif kontrolleri ise steril distile su ve HPV DNA'sı taşımayan sitoloji örnekleri oluşturdu. Kontaminasyonun önlenmesi için nükleik asit saflaştırması, PCR ve elektroforez safhaları farklı laboratuvarlarda yapıldı.

HPV Gerçek Zamanlı PCR: HPV enfeksiyonu ve HPV-16'nın belirlenmesi için gerçek zamanlı PCR yöntemine dayalı ticari bir sistem olan Heliosis™ Human Papilloma Virus (HPV) LC PCR Kit (Metis Biyoteknoloji, Türkiye), üreticinin önerileri doğrultusunda tüm servikal örneklerle uygulandı. Bu sistemde HPV-16 ve tip 16 dışı HPV tipleri saptanabilmektedir. Buna göre PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, ABD) cihazında tamamlanan ilk amplifikasyonu takiben, ürünler LightCycler™ 2.0 (Roche Diagnostics, Almanya) gerçek zamanlı PCR cihazında ikinci amplifikasyon aşamasına alındı; HPV pozitifliği ve HPV-16 saptanması erime eğrisi analizi ile yapıldı. Erime eğrisi analizi sonuçlarında; örneğe DNA saflaştırması aşamasında eklenen internal kontrol için erime sıcaklığı (melting temperature, T_m) 90°C (±3.5°C); HPV amplifikasyon sinyali 82°C (±3.5°C) ve HPV tip 16 için sinyal 69°C (±1.0°C)'de izlenmektedir. Sistemin analitik duyarlılığı HPV-16 ve -18 için 20 kopya/µl olarak verilmektedir.

HPV PCR-Array Hibridizasyon Testi: MY09/11 primerleri ile HPV konsensus PCR sonuçları pozitif olan örnekler, ticari bir PCR-array hibridizasyon yöntemi olan HPV Genoarray Test™ (Rapid HPV Genotyping MacroArray™; HybriBio Inc., Hong Kong) ile üreticinin önerileri doğrultusunda HPV tipleri açısından değerlendirildi. Bu sistemde HPV saptama ve tiplendirmesi yapılmakta, servikal patolojilerde en sık rastlanan yüksek riskli HPV tiplerinden tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ve 68, muhtemel yüksek riskli HPV tiplerinden tip 53; düşük riskli HPV tiplerinden 6, 11, 42, 43, 44, 81 olmak üzere

21 HPV tipi tanımlanabilmektedir. Yöntemin duyarlılığı, farklı HPV genotipleri arasında değişmek üzere 4-89 genom kopyası/μl olarak verilmekte olup, hibridizasyon sırasında çeşitli HPV tipleri arasında çapraz reaksiyon olmadığı belirtilmektedir.

BULGULAR

İncelenen 40 örneğin 14'ünde (%35) MY09/11 primerleri ile yapılan ilk oturumda pozitiflik saptanmış, PCR ikinci turu sonunda ise örneklerin 23'ünde (%57.5) HPV-DNA varlığı belirlenmiştir (Tablo I). Bir ASCUS örneği dışında tüm örneklerde ilk tur PCR pozitif olduğunda ikinci tur da pozitif olarak saptanmıştır. Örneklerde sitolojik tanıların dağılımı, HPV konsensus PCR birinci ve ikinci tur pozitifliklerinin sıklığı Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I. Çalışmada İncelenen Örneklerin Sitolojik Tanılarının Dağılımı, HPV Konsensus PCR, HPV Gerçek Zamanlı PCR ve PCR-array Hibridizasyon Testinin Sonuçları

Sitoloji (n)	Konsensus PCR			Gerçek zamanlı PCR		
	Negatif	1.turda pozitif ^a	2.turda pozitif ^b	HPV pozitif	HPV-16	PCR-array ^c
ASCUS (18)	10	4	8	8	4	9
AGUS (4)	3	1	1	1	–	1
ASC-H (1)	–	1	1	1	–	1
LSIL (14)	4	6	10	10	3	9
HSIL (1)	–	1	1	1	–	1
Ad-Ca ^d (1)	–	–	1	1	–	1
Sk-Ca ^d (1)	–	1	1	1	–	1
Toplam (40)	17 (42.5)	14 (35)	23 (57.5)	23 (57.5)	7 (17.5)	22 (55)

^a MY09/11 primerleri ile PCR.

^b MY09/11 ile PCR sonrasında GP5/6 primerleri ile "nested" PCR.

^c PCR-array hibridizasyon yöntemi sadece tiplendirme için uygulanmıştır.

^d Ad-Ca: Adenokarsinom, Sk-Ca: Skuamoz hücreli karsinom.

Konsensus PCR ile pozitif olan tüm örnekler (23/40, %57.5), gerçek zamanlı PCR ile de pozitif olarak izlenmiştir (Tablo I). Erime eğrisi analizi sonucu, örneklerin 7'sinde (7/22, %31.8) HPV tip 16 saptanmıştır (Tablo I ve II). Konsensus PCR pozitif örneklerin 22'sinde (22/23, %95.7) PCR-Array hibridizasyon testi ile tiplendirme yapılmıştır (Tablo I). Bir LSIL örneğinde (1/23, %4.3), gerçek zamanlı PCR ve konsensus PCR ile ikinci turda pozitiflik saptanmasına karşın, deneyler tekrarlanmasına rağmen tiplendirme yapılamamıştır.

Çalışmada saptanan HPV izolatları; yüksek riskli tipler 16, 18, 31, 45, 52, 56, 58, 59 ve 68, muhtemel yüksek riskli tip 53, düşük riskli tipler ise 6, 42 ve 81 olmuştur (Tablo II). Toplam 38 HPV izolatu tanımlanmış, bunların 25'i yüksek (%65.8), 5'i muhtemel yüksek (%13.2), 8'i ise (%21) düşük riskli olarak belirlenmiştir. HPV pozitif örneklerin 12'sinde (12/22, %54.5) tek viral tipte enfeksiyon (4 adet tip 16, ikişer adet olmak üzere tip 31 ve 58, birer

Tablo II. Tiplendirilen Örneklerin Sitolojik Tanısı, Gerçek Zamanlı PCR ile HPV-16 Saptanan Örnekler ve PCR-array Hibridizasyon Testlerinin Sonuçları

No.	Sitoloji	HPV-16 (gerçek zamanlı PCR)	PCR-array
1	ASCUS	+	16
2	ASCUS	+	16
3	ASCUS	+	16
4	ASCUS	+	16, 58, 81*
5	LSIL	+	16
6	LSIL	+	16, 59
7	LSIL	+	16, 53
8	ASCUS	-	31
9	ASCUS	-	52
10	ASCUS	-	58
11	ASCUS	-	53, 81*
12	AGUS	-	18
13	ASC-H	-	58
14	LSIL	-	31
15	LSIL	-	68
16	LSIL	-	45, 81*
17	LSIL	-	42*, 53, 81*
18	LSIL	-	42*, 51, 68
19	LSIL	-	6*, 16, 59
20	HSIL	-	16, 68
21	Sk-Ca ^a	-	53
22	Ad-Ca ^a	-	16, 53, 68, 81*

*Düşük riskli HPV tipleri.

^aAd-Ca: Adenokarsinom, Sk-Ca: Skuamoz hücreli karsinom.

adet olmak üzere tip 18, 52, 53, 58 ve 68) saptanmıştır. Tekli enfeksiyonların hepsinde etken yüksek ya da muhtemel yüksek riskli HPV tipleridir. Birden fazla tipte ko-enfeksiyon saptanan 10 örneğin (10/22, %45.5) 5'inde 2 farklı tip, 4'ünde 3 farklı tip, 1'inde ise 4 farklı tipte enfeksiyon tanımlanmıştır (Tablo II). Tüm düşük riskli HPV tipleri, yüksek ya da muhtemel yüksek riskli tiplerle ko-enfeksiyonlarda saptanmış, düşük riskli tiplerle tekli enfeksiyon izlenmemiştir. Her iki yöntemle elde edilen HPV tiplendirme sonuçları ve dağılımı Tablo II'de görülmektedir.

En sık saptanan HPV tipi, tip 16 olmuş (10/22, % 45.5); bunu tip 53 (5/22, %22.7), tip 81 (5/22, %22.7), tip 68 (4/22, %18.2), tip 58 (3/22; %13.6), tip 31 (2/22; %9.1), tip 42 (2/22; %9.1), tip 59 (2/22; %9.1) ve diğer HPV tipleri (1/22, % 4.5) takip etmiştir.

HPV tip 16'nin gerçek zamanlı PCR ve array-hibridizasyon yöntemleri ile saptanma özellikleri karşılaştırıldığında; tekli HPV-16 enfeksiyonlarının (4/22, %18.1) her iki yöntemle başarılı olarak tanımlandığı görülmektedir. Bununla beraber array-hibridizasyon testi ile tip 16'nın da etkenler arasında olduğu 6 çoklu enfeksiyon olgusu tanımlanmış (6/22, % 27.2), ancak gerçek zamanlı PCR ile bunların 3'ünde (3/6, %50) tip 16 tanımlanabilmiştir (Tablo II).

TARTIŞMA

Serviks kanseri açısından risk taşıyan kişilerin belirlenmesi ve uygun klinik takibin gerçekleştirilmesi için, rutin sitolojik taramalara ek olarak HPV enfeksiyonu varlığı ve etken tipin saptanması yöntemi yaygın olarak uygulanmaktadır^{12,13}. HPV enfeksiyonlarının tanısında virus izolasyonu ya da serolojik testlerin faydalı olmaması nedeniyle viral nükleik asitlerin gösterilmesi en geçerli yaklaşımdır¹⁴. HPV tiplerinin tanımlanmasında restriksiyon enzim analizi, tipe özgül PCR, “Southern Blot”, mikroplyet ya da strip hibridizasyonu gibi yöntemler uygulanmaktadır; ancak günümüzde kabul edilen altın standart DNA dizi analizidir. Bu yaklaşımla, hem önceden tanımlanan tiplerin güvenilir olarak saptanması mümkün olmakta, hem de daha az sıklıkla izole edilen ya da yeni HPV tiplerinin tanımlanma imkanı sağlanmaktadır. Buna karşın DNA dizi analizi rutin tanı laboratuvarlarında uygulanması zor, pahalı teknik donanım ve yetişmiş personel gerektiren, sonuçların görece olarak daha uzun sürede elde edildiği bir yöntemdir. Bu nedenle HPV saptama ve tanımlanması için çoğu kez diğer moleküler testlerden yararlanılmaktadır. Bunlar arasında ülkemizde de yaygın olarak kullanılan, DNA-RNA hibridlerinin sıvı ortamda antikorlarla yakalanması esasına dayanan Hybrid Capture™ yöntemi (HC II, Digene Corp. ABD), PCR sonrası strip üzerinde hibridizasyona dayalı “Line Probe Assay” (LIPA) (HPV Inno-Lipa™, Innogenetics, Belçika) veya ELISA esasına dayalı (Roche Amplicor™ HPV Assay, Roche Diagnostics, Almanya) sayılabilir. Benzer şekilde değişik PCR ya da hibridizasyon formatlarının kullanıldığı çeşitli deneysel tanı yöntemleri de geliştirilmiştir. Son yıllarda gerçek zamanlı PCR ve DNA mikroarray yöntemleri de HPV tiplendirilmesi için sıklıkla kullanılır hale gelmiştir¹⁴. Bu çalışmada, servikal sitoloji değerlendirmesinde atipi saptanan bir grup olgunun servikal örneklerinde tek oturumlu ve “nested” konsensus PCR yöntemleri uygulanarak HPV enfeksiyonunun gösterilmesi amaçlanmış; ticari bir gerçek zamanlı (real-time) PCR yöntemi ile HPV varlığı ve HPV-16 araştırılmış, ayrıca ticari bir array-hibridizasyon yöntemi ile de HPV tiplendirilmesi yapılmıştır.

Çalışmada incelenen örneklerin %57.5’ünde (23/40), “nested” PCR ile HPV DNA’sı saptanmış, tek oturumlu PCR ile viral DNA saptama oranı ise %35 (14/40) olarak izlenmiştir (Tablo I). Tek oturumlu PCR yerine “nested” PCR uygulanmasının HPV-DNA saptama oranını belirgin olarak artırdığı bilinmektedir^{11,15}. Çalışmamızda elde edilen HPV saptama oranları bu görüşleri doğrular niteliktedir. Benzer sonuçlar sitolojik atipi izlenen servikal sürüntü örneklerinde yaptığımız diğer bir çalışmada da izlenmiş, iki yöntem arasında saptama sıklığı açısından anlamlı bir fark ortaya konulmuştur¹⁶. Bununla birlikte “in-house nested” PCR uygulaması, sarf malzemesi kullanımı ve kontaminasyon riski açısından dezavantajlı olması ve sonuçlar elde edildikten sonra tiplendirme amacıyla diğer yöntemlere ihtiyaç duyulması nedeniyle rutin tanıdan çok araştırma amaçlı başvuru bir yaklaşım olmaktadır. Rutin tanı amaçlı sistemlerde, tek oturumlu PCR ve gerçek zamanlı PCR, hibridizasyon/tipe özgül primerler gibi yaklaşımların kombinasyonu, klinik karar verme sürecinde yeterli duyarlılığa sahip olmaktadır¹⁴. Bu çalışmada uygulanan gerçek zamanlı

PCR sistemi ile, konsensus “nested” PCR ile pozitif örneklerin tamamı pozitif olarak bulunmuştur. PCR-array hibridizasyon yöntemi ise çalışmada sadece tiplendirme amacıyla kullanılmış olmasına karşın, belirtilen analitik duyarlılığı (4-89 kopya/ μ l) ile klinik örneklerden saptama amaçlı kullanıma uygundur.

Çalışmada incelenen örneklerin %95.7’si (22/23) başarılı olarak tiplendirilmiş, %4.3’ünde ise (1/23) array ya da gerçek zamanlı PCR yöntemleri uygulanarak, deneyler tekrarlanmasına rağmen tiplendirme yapılamamıştır. Çalışmada HPV tiplendirmesi yapılan izolatların %65.8’sinde (25/38) yüksek riskli, %13.2’sinde (5/38) muhtemel yüksek riskli ve %21’inde (8/38) düşük riskli HPV tipleri saptanmıştır (Tablo II).

HPV tiplerine ait prevalansların incelendiği geniş epidemiyolojik çalışmalar ve meta-analizlerde, normal ya da değişik derecede atipi izlenen örneklerde en sık rastlanan HPV tipi HPV-16 olarak rapor edilmektedir¹⁷⁻¹⁹. Serviks kanseri olgularında da HPV-16 ve -18 tüm dünyada en sık rastlanan tip olmakta, ancak diğer HPV tiplerinin dağılımında bölgeler arası değişiklikler izlenmektedir. Coğrafi bölgeler arasında izlenen en belirgin farklar HPV-16 sıklığı ve bunu takip eden tiplerin sırasında izlenmektedir^{4,18}. Örnek olarak Avrupa ülkelerinde HSIL olgularındaki tip 16’nın sıklığı, Asya’da izlenen orana göre daha yüksektir¹⁹. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda HPV prevalansı çeşitli yöntemlerle %2.1-%6.1 olarak saptanmış, epitelyal hücre anomalisi izlenen örneklerde ise %42.9’a ulaştığı bildirilmiştir²⁰⁻²³. Bizim MY09/11 ve GP5/6 primerleri ile yaptığımız diğer bir çalışmada, sitolojik atipi izlenen servikal örneklerde HPV-DNA %80 oranında saptanmış; dizi analizi ile örneklerin %78.6’sında yüksek/muhtemel yüksek riskli tipler 16, 18, 31, 33, 45, 53, 56, 59 gösterilmiştir¹⁶. HPV tip 16, örneklerin %50’sinde saptanmış, onu tip 18 (%10.7) ve tip 53 (%7.1) takip etmiştir¹⁶. Bu çalışmada da, HPV-16 yine en sık saptanan tip olarak (%45.5) izlenmiş; ardından tip 53 ve 81 (%22.7); tip 68 (%18.2); tip 58 (%13.6), tip 31, 42, 58 ve 59 (%9.1) gelmiştir. Dikkat çekici bir nokta ise örneklerdeki yüksek/muhtemel yüksek riskli HPV tiplerinin yoğunluğudur. Çalışmada saptanan tüm düşük riskli HPV tipleri, çoklu enfeksiyonlarda yüksek ya da muhtemel yüksek riskli tiplerle birlikte bulunmaktadır (Tablo II).

Son zamanlarda elde edilen veriler, aynı kişide değişik HPV tipleri ile çoklu enfeksiyonların öngörülenden daha yüksek oranda meydana geldiğini ortaya koymaktadır^{14,24}. Özellikle HIV ile enfekte kişiler ve ilerlemiş sitolojik atipi izlenen örneklerde çoklu HPV enfeksiyonu oranının daha da yüksek olabileceği rapor edilmiştir^{25,26}. Kişide birden fazla HPV tipinin aynı anda bulunması durumunda, virus ile tekrarlayan maruziyet ve artmış ilerleyici atipi olasılığı taşıdığı düşünülmektedir. Bununla birlikte viral persistans da atipi oluşumu için önemli bir risk faktörüdür. Varolan HPV enfeksiyonunun persistans oluşturduğu ancak takip sırasında elde edilen örneklerde aynı viral tiplerin saptanması ile doğrulanabilmektedir^{25,26}. Çalışmamızda birden fazla HPV tipiyle ko-enfeksiyon, örneklerin %45.5’inde (10/22) saptanmış bunların %50’si iki farklı tip, kalan bölümünde ise üç ile dört farklı HPV tipiyle enfeksiyon varlığı gösterilmiştir (Tablo II). Çoklu enfeksiyonların saptanması konusunda, HPV tanısı için

uygulanan yöntemin de önemi vardır. Çalışmalar PCR-ters hibridizasyona dayanan deneysel ya da ticari sistemlerin, çoklu enfeksiyonları saptamada DNA dizi analizine göre daha başarılı olduğuna işaret etmektedir^{14,15}. Benzer bir avantaj, çalışmamızda kullandığımız PCR-array hibridizasyon testleri için de geçerlidir¹⁴.

Çalışmamızda tüm örneklerle PCR-array hibridizasyonu testinin yanı sıra, çok sık karşılaşılan HPV tiplerinden HPV-16 için erime eğrisi analizi ile tipe özgül tanımlama sağlayan ticari bir gerçek zamanlı PCR yöntemi de uygulanmıştır. Buna göre sadece HPV-16'nın etken olduğu enfeksiyonlar (4/22, %18.1) her iki yöntemle başarılı olarak saptanmıştır. Ancak tip 16'nın etkenler arasında olduğu altı (6/22, %27.2) çoklu enfeksiyon olgusunun üçünde, gerçek zamanlı PCR ile HPV pozitifliği saptanmasına karşın, HPV-16'nın varlığı gösterilememiştir (Tablo II). Farklı HPV tipleri ile çoklu enfeksiyonların söz konusu olduğu örneklerde çeşitli tiplendirme yaklaşımları ile uyumsuz sonuçlar bildirilmektedir. Burada örnekte bulunan HPV tiplerinin viral yükleri arasındaki farklılıklar da önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, uygulanan yöntemlerin her HPV tipi için saptama duyarlılığında olabilecek farklılıkların, örnekte bulunan tiplerin kopya sayılarının ve muhtemel varyant varlığının farklı saptama sistemlerinden elde edilen uyumsuz sonuçlara etkisi olabileceği belirtilmektedir^{27,28}.

Çalışmamızın kısıtlılıkları arasında, görece olarak az sayıda örneğin incelenmesi ve sıklıkla ASCUS ve LSIL gibi düşük düzey atipi gösteren örneklerin çalışma grubunun çoğunluğunu oluşturması (32/40; %80) sayılabilir. Bununla birlikte HPV çeşitliliği yönünden önem taşıyan düşük düzey atipi saptanan örneklerde etken olan HPV tiplerinin gösterilmesi, ayrıca ko-enfeksiyonlar konusunda veri sunulması önemlidir. Ülkemizde HPV prevalansı ve aşı etkinliğinin takibi için bu konudaki çalışmaların artırılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005; 32 (S): 1-6.
2. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27.
3. 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.
4. 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.
5. Baseman JG, Kautsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32S: S16-S24.
6. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Rev Med Virol* 2006; 16: 139-49.
7. 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.
8. 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.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Cronje HS. Screening for cervical cancer in developing countries. *Int J Gynecol Oncol* 2004; 84: 101-8.
14. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 43-51.
15. Husnjak 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.
16. Ergunay K, Misirlioglu M, Pinar F, Tuncer ZS, Tuncer S, Ustacelebi S. Investigation of human papilloma virus DNA in cervical samples with cytological abnormalities and typing of the virus. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 219-26.
17. 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: 453-9.
18. 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.
19. 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.
20. Onan MA, Taskiran C, Bozdayi 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.
21. Ozcelik B, Serin IS, Gokahmetoglu S, Basbug 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.
22. Ozturk 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.
23. Tuncer S, Ustaçelebi Ş. Servikal biyopsi örneklerinde insan papillomavirusları tip 16 ve 18'in polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Flora* 1996; 1: 40-4.
24. van den Brule AJ, Pol R, Franssen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 779-87.
25. Goncalves MAG, Massad E, Burattini MN, Villa L. Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, Sao Paulo. *Brazil Int J STD Aids* 1999; 10: 803-7.
26. Levi JE, Kleter B, Quint WG, et al. High prevalence of human papillomavirus infections and high frequency of multiple genotypes in HIV-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3341-5.
27. Gillio-Tos A, De Marcoa L, Ghisetti V, et al. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. *J Clin Virol* 2006; 36: 126-32.
28. Roberts CC, Tadesse AS, Sands J, et al. Detection of HPV in Norwegian cervical biopsy specimens with type-specific PCR and reverse line blot assays. *J Clin Virol* 2006; 36: 277-88.