

**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**ESKİŞEHİR BÖLGESİ'NDE KADINLARDA HUMAN  
PAPİLLOMA VİRUS (HPV) DNA'SININ İKİ FARKLI  
MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILIP  
TİPLENDİRİLMESİ VE PAP SMEAR TESTİ İLE  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Ferhat Gürkan ASLAN**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR  
2012**



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**ESKİŞEHİR BÖLGESİ'NDE KADINLARDA HUMAN  
PAPİLLOMA VİRUS (HPV) DNA'SININ İKİ FARKLI  
MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILIP  
TIPLENDİRİLMESİ VE PAP SMEAR TESTİ İLE  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Ferhat Gürkan ASLAN**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Tercan US**

**ESKİŞEHİR  
2012**

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Ferhat Gürkan ASLAN'a ait "Eskişehir Bölgesi'nde kadınlarda human papilloma virus (HPV) DNA'sının iki farklı moleküler yöntemle araştırılıp tiplendirilmesi ve Pap smear testi ile karşılaştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 13/11/2012

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Tercan US Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye	Prof. Dr. Yurdanur AKGÜN Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye	Yrd. Doç. Dr. Nilgün KAŞİFOĞLU Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulunun ...../...../2012  
Tarih ve ... .. Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bekir YAŞAR  
Dekan

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında büyük emeği geçen, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, bu çalışmayı gerçekleştirebilecek düzeye gelmemi sağlayan, her konuda desteğini yanımda hissettiğim değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Tercan US'a; uzmanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilimsel ufkumu genişleten değerli hocalarım, Prof. Dr. Gül DURMAZ, Prof. Dr. Filiz AKŞİT, Prof. Dr. Yurdanur AKGÜN, Doç. Dr. Nihal DOĞAN, Doç. Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ, Yrd. Doç. Dr. Nilgün KAŞİFOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÖZ'e; çalışmamızın her aşamasında bizlere büyük destek veren değerli hocalarımız Prof. Dr. S. Sinan ÖZALP ve Yrd. Doç. Dr. Tufan ÖGE'ye; çalışma verilerinin anlizindeki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Ahmet MUSMUL'a; çalışmam boyunca bana gösterdikleri iyi niyet ve verdikleri desteklerden dolayı Dr. Müge ASLAN ve Dr. Nazmiye Ülkü TÜZEMEN'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

## ÖZET

**Aslan, FG. Eskişehir Bölgesi'nde Kadınlarda Human Papilloma Virus (HPV) DNA'sının İki Farklı Moleküler Yöntemle Araştırılıp Tiplendirilmesi ve Pap Smear Testi ile Karşılaştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2012.** HPV enfeksiyonu, cinsel temasla bulaşan en sık hastalık olup; asemptomatik enfeksiyondan anogenital kansere kadar geniş bir klinik spektruma sahiptir. Serviks kanserlerinin %99'undan yüksek riskli HPV tipleri sorumludur. Bu araştırmada, Eskişehir Bölgesi'nde 30-65 yaş arası kadınların servikal örnekleri Pap smear ve iki farklı moleküler yöntemle çalışılmış, HPV prevalansı ve tip dağılımı belirlenmiş, üç yöntemin sonuçları birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Araştırmaya dahil edilen 1081 kadından alınan servikal örneklerin 40'ı ASCUS (Atypical squamous cells of undetermined significance), 3'ü AGUS (Atypical glandular cells of undetermined significance), 3'ü HGSIL (High grade squamous intraepithelial lesion), 1'i LGSIL (Low grade squamous intraepithelial lesion) olarak raporlanmış; 32 örnekte Hybrid Capture 2 (HC 2) ile HPV varlığı saptanmış, bunların 22'si yüksek riskli olarak belirlenmiştir. Pap testi sonucu pozitif olan servikal örneklerin 42'si (36 ASCUS, 3 AGUS, 2 HGSIL, 1 LGSIL) HC 2 ile negatifken; HC 2 ile yüksek riskli pozitif saptanan 19 örnek Pap testi ile negatif olarak raporlanmıştır. Rastgele seçilen 152 kadın grubunda ise konsensus Real-Time PCR ile 53 örnekte HPV DNA saptanmıştır. Bunların 32'si HC 2 ile de pozitif iken 21'i negatiftir. Örneklerden 5'i üç yöntemle de pozitif bulunmuştur. Pap testi sonucu pozitif olan 31 (27 ASCUS, 3 AGUS, 1 HGSIL) örnek konsensus Real-Time PCR ile negatif saptanırken; konsensus Real-Time PCR ile yüksek riskli ve/veya muhtemel yüksek riskli saptanan 28 örnek ise Pap testi ile negatif olarak değerlendirilmiştir. Eskişehir Bölgesi'nde en çok rastlanan genotipler sırasıyla; HPV tip 16, tip 90 ve tip 18 olmuştur. HPV'nin etiolojideki önemi nedeniyle moleküler testlerin servikal kanser taramasında sitoloji ile birlikte kullanılması önerilmektedir. HPV ve serviks kanseri konusunda toplum bilinçlendirilmeli, aşı uygulaması ve tarama yöntemleri hedef gruba ulaştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Eskişehir, genotip, HC 2, HPV, Pap test, PCR  
Destekleyen Kuruluş: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi

## ABSTRACT

**Aslan, FG. Investigation and typing of human papillomavirus (HPV) DNA by two different molecular assays in women in Eskişehir region and comparison with Pap smear test. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Medical Microbiology, Eskişehir, 2012.** HPV infection is the most common sexually transmitted disease and it has a wide clinic spectrum as the asymptomatic infection to the cervical cancer. High risk (HR) HPV types are responsible of 99% of cervical cancers. In this study, cervical samples of women between ages 30-65 were evaluated by Pap smear and two different molecular methods, and the prevalence of HPV and type distribution were determined, the results of three assays were compared with each other. Cervical samples obtained from 1081 women, ASCUS (Atypical squamous cells of undetermined significance) was reported in 40, AGUS (Atypical glandular cells of undetermined significance) was reported in 3, HGSIL (High grade squamous intraepithelial lesion) was reported in 3, and LGSIL (Low grade squamous intraepithelial lesion) was reported in 1. HPV was detected in 32 samples by Hybrid Capture 2 (HC 2) and 22 of them were determined as HR HPV. In 42 of the samples that were positive with Pap smear, HC 2 was negative and 19 samples that were positive for HR HPV was negative by Pap smear. In other randomised group of 152 women, 53 samples were positive with consensus Real-Time PCR and 32 of them were positive by HC 2, but 21 of them were negative by HC 2. Five samples were positive by all of the three assays. In 31 samples that were positive by Pap test, consensus Real-Time PCR was negative. However, in 28 samples that were positive for HR and/or IR (intermediate risk) HPV by consensus Real-Time PCR, Pap test was negative. The most frequent genotypes were determined as; HPV type 16, type 90 and type 18 respectively, in Eskişehir Region. Because of the importance of HPV at the cancer etiology it is recommended to use both cytology and molecular assays in cervical cancer screening. People should be aware of HPV and cervical cancer, and vaccination and cervical cancer screening programs should reach the target population.

Key Words: Eskişehir, genotype, HC 2, HPV, Pap test, PCR  
Supported by: Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine,  
Cancer Early Detection, Scanning and Training Center

**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Tarihçe	3
2.2.Epidemiyoloji	5
2.3.Virus Yapısı ve Genel Özellikleri	8
2.4.Sınıflandırma	9
2.5.Patogenez	13
2.6.İmmünite	16
2.7.HPV Aşıları	20
2.8.Klinik Belirtiler	22
2.8.1.Anogenital Siğiller	22
2.8.2.Vulva-Vaginal Siğiller	23
2.8.3.Perianal Siğiller	23
2.8.4.Penil Siğiller	23
2.8.5.Epidermodysplasia Verruciformis	23
2.8.6.Genital Olmayan Deri Siğilleri	24
2.8.7.Servikal Kanser	24
2.8.8.Vulvar Kanserler	26
2.8.9.Vajina Kanseri	26
2.8.10.Anal Kanser	27
2.8.11.Baş ve Boyun Kanserleri	27
2.9.Servikal Kanser Taraması	27



	Sayfa
2.10.Tanı Yöntemleri	31
2.10.1.Direk Hibridizasyon	32
2.10.2.Sinyal Amplifikasyon Testi	33
2.10.3.Nükleik Asit Amplifikasyon Testi	35
2.10.4.Tanıda Yeni Gelişmeler	39
2.11.Tedavi	40
2.12.Korunma	41
3.GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1.Örnek Toplama	42
3.2.Sinyal Amplifikasyon Yöntemi (HC 2) ile HPV DNA Varlığının Saptanması	43
3.3.HPV Konsensus Real-Time Polimerize Zincir Reaksiyonu ve Dizi Analizi	47
3.4.Pyrosequencing ile Genotip Tayini	50
3.5.İstatistiksel Analiz	55
4.BULGULAR	56
4.1.Pap smear ve Sinyal Amplifikasyon (HC 2) Yöntemlerinin Bulguları	58
4.2.Konsensus Real-Time PCR, HC 2 ve Pap Testi Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve Pozitif Bulunan Örneklerin Pyrosequencing Yöntemi ile Tiplendirme Sonuçları	63
5.TARTIŞMA	70
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	85
EKLER	
Ek 1:	
Ek 2:	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AGUS	Atypical glanduler cells of undetermined significance
ASC-H	Atypical squamous cells-HGSIL dışlanamayan
ASCCP	American Society of Colposcopy and Cervical Pathology
ASCUS	Atypical squamous cells of undetermined significance
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia
CIS	Carsinoma in situ
CRPV	Cottontail Rabbit Papillomavirus
DBH	Dot Blot Hibridizasyon
DNA	Deoksiribonükleik asid
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Floresans In-situ Hibridizasyon
HC 2	Hybrid Capture 2
HIV	Human Immun Deficiency Virus
HPV	Human Papilloma Virus
HR HPV	High risk Human Papilloma Virus
HGSIL	High grade squamous intraepithelial lesion
IR HPV	Intermediate risk Human Papilloma Virus
ISH	In-situ Hibridizasyon
LCR	Long Control Region
LR HPV	Low risk Human Papilloma Virus
LGSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion
ICTV	International Council on Taxonomy of Viruses
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asid
NPD	Negatif Prediktif Değer
OKS	Oral Kontraseptif
ORF	Open Reading Frame
pA	Polyadenylation

Pap	Papanicolau
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pg	Pikogram
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RLU	Relative Light Unit
RNA	Ribonükleik asid
SBH	Southern Blot Hibridizasyon
URR	Upstream Regulatory Region
VLP	Virus Like Particule

**ŞEKİLLER**

	Sayfa
2.1. Human papillomavirus genom yapısı	8
2.2. Bazal tabaka hücrelerinin enfeksiyonu ve HPV replikasyonu	14
4.1. Konsensus Real-Time PCR görüntüsü	63
4.2. 152 kadından oluşan araştırma grubunda yöntemlere göre pozitiflik ve negatiflik sayıları	64

## TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Bölgelere göre HPV prevalansı	7
2.2. Onkojenik risk potansiyellerine göre HPV'lerin gruplandırılması	11
2.3. İnsanda enfeksiyon oluşturan HPV tipleri ve ilişkili hastalıklar	12
3.1. Kombine prob karışımı	44
3.2. Detection reagent-1 için belirtilen oranlar	46
3.3. Detection reagent-2 için belirtilen oranlar	46
3.4. Amplifikasyon karışımı için belirtilen oranlar	49
3.5. Bağlanma karışımı için belirtilen oranlar	51
3.6. Birleşme karışımı için belirtilen oran	52
4.1. Araştırma grubunda bazı değişkenlerin ortalama değerleri	56
4.2. Araştırma grubunda değişkenlerin dağılımı	57
4.3. HC 2 ve Pap smear sonuçları karşılaştırması	58
4.4. Pap smear sonuçları dağılımı	59
4.5. HC 2 testi pozitif 32 servikal sürüntü örneğinin grup içi dağılımı	59
4.6. Pap smear testi ve HC 2 test sonuçlarının 1081 kadında karşılaştırılması	60
4.7. HC 2 testi ile pozitif saptanan kadınların anket sonuçları	61
4.8. Rastgele seçilen kadın grubunda bazı değişkenlerin ortalama değerleri	64
4.9. Konsensus Real-Time PCR ve/veya HC 2 testi ile pozitif saptanan 53 örneğin HPV risk grubu dağılımı	66
4.10. Konsensus Real-Time PCR ve/veya HC 2 yöntemi ile pozitif saptanan örneklerin, Pyrosequencing yöntemi ile belirlenen genotip dağılımı	67
4.11. Pap smear sonuçları ile genotip dağılımlarının karşılaştırılması	68
5.1. Ülkemizde yapılan HPV çalışmaları	80

## 1.GİRİŞ

Eskiden *Papovaviridae* olarak isimlendirilen virus ailesi artık iki virus ailesine bölünmüştür; *Papillomaviridae* ve *Polyomaviridae*. *Papillomaviridae* ailesinden papillomavirus genusuna ait human papillomaviruslar (HPV) deri ve mukozada çeşitli benign ve malign lezyonların gelişmesine neden olurlar. Siğil en yaygın lezyon olmasına rağmen en çok ilgi, neoplazi ile ilişkili genital enfeksiyonlar üzerinde yoğunlaşmıştır [1, 2, 3].

Papillomaviruslar; küçük, zarfsız, ikozahedral kapsidli ve 8000 baz çifti (bç) içeren çembersel çift sarmallı deoksiribonükleik asit (çsDNA) genomuna sahip viruslardır. Hücre büyümesini destekleyen proteinleri kodlarlar; böylece permisif hücre tiplerinde litik viral enfeksiyonları kolaylaştırırken, nonpermisif olan bir hücreyi onkojenik hale dönüştürebilirler [1].

Bulaş, cinsel ilişki sırasında deri ve mukoza teması ile olmakta ve serviks geçiş zonu başta olmak üzere, diğer dış genital organlara da yerleşebilmektedir. Perinatal bulaşma olasılığı nadir de olsa bulunmaktadır. Bağışıklığı baskılanmış bireylerde bulaş çok daha kolay gerçekleşebilir [1, 4].

HPV'lerin sınıflandırılması DNA dizi homolojilerine göre yapılmaktadır. Günümüzde bu küçük çsDNA viruslarının 200'den fazla genotipi olduğunu işaret eden veriler bulunmakta; 100 kadarının ise tüm genom dizisi bilinmektedir. Genital tip olarak bilinen yaklaşık 60 genotip seksüel yolla geçer ve genital yol kanserleriyle ilişkilerine dayanılarak; düşük riskli, muhtemel yüksek riskli ve yüksek riskli genotipler olarak gruplandırılırlar [1, 5, 6].

Günümüzde yüksek riskli HPV genotiplerinin serviks kanseri olgularının %99'undan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Dünya genelinde yapılan çalışmalarda bu tablonun %50-60'ında HPV tip 16, %10-12'sinde ise HPV tip 18 etken olarak saptanmıştır. Ayrıca HPV tip 16 ve HPV tip 18'in; vulvar, anal, orofaringeal kanserler gibi, serviks kanseri dışında başka kanser türlerinde de etken olarak saptanmaları, aşı çalışmalarında bu iki genotip üzerinde yoğunlaşılmasına neden olmuştur [6-8].

HPV ve servikal kanser arasındaki ilişki ilk kez 1977 yılında zur Hausen tarafından bildirilmiştir. Servikal kanser kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci en sık görülen kanser olup prekanseröz lezyonların tespiti ve tedavisi ile büyük

oranda önlenabilir bir hastalıktır. Servikal kanser vakalarının çoğunluğu servikal kanser tarama programlarının etkili bir şekilde yapılmadığı veya uygulanamadığı gelişmekte olan ülkelerde görülür [9, 10].

Servikal prekanseröz lezyonlar, sitolojik tarama testi olan Papanicolau (Pap) test kullanılarak, servikal hücrelerin analizi ile tespit edilebilir. HPV enfeksiyonu ve servikal kanser arasındaki kuvvetli etiyolojik ilişki HPV testinin servikal kanser taramasında sitolojiye ilave yardımcı bir tarama testi olarak veya Pap testine alternatif tek başına bir tarama testi olarak değerlendirilmesine yol açmıştır. Bu strateji servikal kanser için riskli popülasyonların erken tanınmasını sağlamaktadır; üstelik normal Pap smear ve negatif HPV DNA testinin negatif prediktif değeri (NPD) %99-100'dür [11, 12].

Sonuç olarak önlenabilir kanser olarak düşünülen serviks kanseri taramalarında HPV DNA'nın erken dönemde saptanması, HPV tiplerinin belirlenmesi klinik ve epidemiyolojik açıdan büyük önem taşır. Günümüzde farklı HPV tiplerinin bölgesel dağılımının belirlenmesi ve HPV enfeksiyonları ile sosyal gruplar arasındaki ilişkileri araştırarak bu viral enfeksiyonun kontrolü ve önlenmesi konusunda bilgiler elde edilebilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Türkiye'de bu konuda yapılmış sınırlı sayıda çalışma olduğu için HPV enfeksiyonunun sıklığı, takip ve tedavisi konusunda ayrıntılı bilgi yeterli değildir.

Bu çalışmada, Eskişehir bölgesinde, 30-65 yaş arası kadınlarda HPV DNA varlığı araştırılmış ve var olan tiplerin sıklığı değerlendirilmiştir. Bu amaçla araştırmaya katılan kadınlardan alınan servikal sürüntü örneklerinin tümünde HPV DNA varlığı, bir sinyal amplifikasyon yöntemi olan Hybrid Capture 2 (HC 2) ile test edilmiş, örneklerin patolojik değerlendirmesi ise Pap smear testi ile yapılmıştır. Ayrıca araştırmaya alınan kadınlar arasından rastgele seçilen bir grup kadında ise konsensus Real-Time PCR yöntemi ile HPV DNA varlığı araştırılmış ve pozitif bulunan örneklerde pyrosequencing ile dizi analizi yapılarak genotip belirlenmiştir. Böylece HPV DNA varlığını saptamada bu iki moleküler yöntemin performansları değerlendirilmiştir. Ayrıca her iki moleküler yöntemin sonuçları Pap smear test sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Tarihçe

Human papillomavirusların (HPV) etken olduğu siğillerin varlığı ve bulaşıcı oldukları Antik Yunan ve Roma'dan beri bilinmekteydi. Ancak 19.yy'ın başlarına kadar genital siğillerin, sifiliz veya gonoreenin bir formu olduğu düşünülmekteydi [4].

İtalyan fizikçi Domenico Antonio Rigoni Stern 1760-1839 tarihleri arasında Verona'da uterus kanserinden ölenleri incelemiş; bekarlar ve rahibelerde evli ve dul kadınlara oranla uterus kanserinin çok daha nadir bulunduğunu gözlemiş ve 1842 yılında bunun HPV'ye bağlı olduğunu ileri sürmüştür [13].

İnsan siğillerinin viral etyolojisinden ilk kez Ciuffo bahsetmiştir. Ciuffo hücresiz siğil ekstraktlarını kendi eline intradermal olarak inoküle etmiş ve yeniden siğil oluşumu ile siğillerin bulaşıcılığını 1907'de açıklamıştır [14].

Bu virüslere karşı en büyük ilgi 1930'larda başlamış ve ilk papillomavirus 1933 yılında tanımlanmıştır. "Bakteri filtrelerinden" geçtiği gösterilen ilk mikroorganizmalar olan papillomavirusların, 1930'lu yıllarda tavşanlarda epitelyum kanserine yol açtığı saptanmış, 1970'li yıllarda ise insanda servikal kanser ile ilişkisi belirlenmiştir [8, 15].

Shope 1933'de papillomavirusların retrovirüslerden sonra malignensiye sebep olan ikinci virus olduğunu bildirmiştir. Shope ve Hurst, vahşi Kuzey Amerika Pamuk Kuyruklu Tavşanlar'da oluşan kutanöz papillomlarda papillomavirusu göstermiş ve hastalığın bulaşıcı olduğunu bulmuşlardır. Etken sonradan "cottontail rabbit papillomavirus" (CRPV) olarak adlandırılmıştır. Evcil pamuk kuyruklu tavşanlarda CRPV'nin malign deri lezyonlarına sebep olduğu ilk kez Rous ve Beard tarafından 1935 yılında gösterilmiştir. Papilloma modeli olarak 1930'lu yıllardan 1940'ların ortalarına kadar pamuk kuyruklu tavşan kültürü yapılmıştır [15].

Lutz 1946'da ve Jablonska ve Millewski 1957'de inokülasyon deneyleriyle siğillerdeki viral etiyolojiyi ispatlamışlardır. Bu siğillerde görülen partiküllerin deride skuamöz hücreli kanserin gelişimine neden olma potansiyeline sahip olduğunu esasen Jablonska göstermiştir. 1950-1960'lı yıllarda yapılan çalışmalar çok yoğun olmamakla beraber, bu dönemde HPV replikasyonu ile enfekte epitelyumun



farklılaşma işlemi arasındaki ilişkinin ispatlanması ile HPV virionunun fizikokimyasal analizini de içeren bazı önemli ilerlemeler gerçekleşmiştir [4].

1961’de Ito ve Evans karsinomanın enfeksiyöz HPV DNA’sı içerdiğini göstermişlerdir. İnsan papillomatöz lezyonlarının virus enfeksiyonları ve karsinogenez ile ilişkisinin anlaşılması çok yavaş olmuştur. İnsan siğillerinin bulaşıcı etiolojisinin hücreye bulaşmaya dayandığı açıkça kanıtlanırsa da, onlara esasen kozmetik bir kusur gözüyle bakılmış ve herhangi bir önemli sağlık sorununa yol açmadığı düşünülmüştür [16].

Moleküler klonlama yöntemlerinin 1970’li yıllarda geliştirilmesi ve bilim adamlarının papillomavirus genomunu klonlamayı başarmaları ile birlikte HPV genotiplerinin varlığı anlaşılmıştır. Böylece HPV tiplerinde klinik ve moleküler çalışmalar oldukça farklılaşmış, HPV tipleri ile servikal kanser arasında güçlü ilişki bulunduğu tespit edilmiştir. Genom sekanslama sürecinin tamamlanması beraberinde genomda “open reading frames” (ORF) bölgelerinin tanımlanmasını sağlamış, bunun yanı sıra araştırmacılar viral genlerin fonksiyonları hakkında da bilgi sahibi olmuşlardır. Sonuç itibarı ile HPV’nin viral onkogeneze yeni model olarak kabul edilmesi söz konusu olmuş ve tıp alanındaki önemi oldukça artmıştır [17, 18].

Papillomavirus araştırmaları, orofaringeal kanser alt kümeleri diğer anogenital kanserler ve serviks kanserine neden olan özgül HPV tiplerinin izolasyonu ile sonuçlanmıştır. Genital siğillerden HPV tip 6 DNA’sının izolasyonu 1980 yılında, laringeal siğillerden HPV tip 11 izolasyonu 1982 yılında başarılmıştır [16].

HPV ile serviks kanseri arasındaki ilişki ilk kez 1977 yılında zur Hausen tarafından bildirilmiştir. Günümüze kadar yayınlanan birçok epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmalarından elde edilen bilgiler, serviks kanseri ve öncü lezyonlarının gelişiminde HPV enfeksiyonunun en önemli basamaklardan biri olduğunu ortaya koymuştur [19].

Zur Hausen HPV tarihçesine değindiği çalışmasında; 1982 yılında Gissmann ve arkadaşlarının HPV’yi 3 invaziv kondiloma aküminata biyopsisinden izole ettiklerini belirtmiştir. 1983’de Dürst ve arkadaşları servikal kanser biyopsilerinde HPV tip 16 varlığını saptamış, aynı grup anogenital kanserlerin prekürsör lezyonlarından da HPV tip 16’yı izole etmişlerdir. 1985’te Schwarz ve arkadaşları

servikal kanserde E6 ve E7'nin selektif transkripsiyonunu tanımlamasının ardından, 1990'da Werness ve arkadaşları E6 proteini ile p53 etkileşimini bildirmiştir. 1993'te Lambert ve arkadaşlarının transjenik hayvanlarda tümör oluşumunu göstermesi ile HPV'nin onkojenik potansiyeli üzerinde durulmuştur. 2000 yılında Soto ve arkadaşları HPV ile malign konversiyonu tanımlamışlardır. En son gelişmelerden HPV aşılı ise 1996'da Zur Hausen ve 2006'da Lowy tarafından bildirilmiştir. HPV ile servikal kanser arasında %99.9 oranında nedensel bir ilişki saptayan Zur Hausen 2008 Nobel Tıp Ödülünü almıştır [20].

## 2.2.Epidemiyoloji

Türe özgül, küçük (8 kb), çift sarmallı DNA (deoksiribonükleik asit) virusu olan HPV deriyi ve mukozal epitelyal yüzeyleri enfekte ederek proliferatif lezyonlara neden olur. Bu virus kontamine yüzeyler (eşyalar, havlular vb.) ile indirekt olarak, deri ve mukozadaki çatlaklardan ise direkt olarak bulaşabilmekle birlikte, temel bulaş cinsel ilişki ile olmaktadır. Seksüel yolla bulaş için koitus mutlak gerekli olmayıp; skroto-labial (deri-deri teması), oro-labial ve parmak-labial temas yeterlidir. Bu nedenle düzenli ve doğru kullanılmış olsa bile kondomun koruyuculuk etkinliği sınırlıdır. Ayrıca nadir olarak perinatal bulaş da söz konusudur [7, 21].

HPV enfeksiyonu, cinsel temasta bulaşan hastalıklar içerisinde en sık görülenidir. Avrupa verilerine göre kadınların %50-80'i hayatları boyunca en az bir defa HPV ile enfekte olmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) cinsel olarak aktif kişilerin %1'inde gözle görülür genital siğillerin olduğu, %15'ten fazla kişinin subklinik enfeksiyona sahip olduğu, 50 yaşına varıldığında ise HPV'ye maruziyetin %80'lere ulaştığı bildirilmektedir. Çok sayıda cinsel partner, yaş, cinsiyet, yüksek parite, sigara kullanımı, uzun süreli oral kontraseptif (OKS) kullanımı, diğer seksüel geçişli hastalıklar, yasadışı ilaç (uyuşturucu) kullanımı, immün baskılanma, meyve sebzedden fakir beslenme, ailede servikal kanser öyküsü ve etnik köken, enfeksiyon ve kansere ilerleme riskini artıran faktörlerdir [1, 2, 7, 22].

Her yıl dünyada 30 milyon yeni genital HPV vakası ortaya çıkmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 20 milyon kişinin HPV ile enfekte olduğu ve bu kişilerin %50'sinin 15-24 yaş arasında olduğu ileri sürülmektedir. Buna

ilaveten 15-44 yaş erkek ve kadınlarda her yıl 6.2 milyon yeni vaka saptanmaktadır. En yüksek prevalans %30 oranında 25 yaş ve altındaki cinsel olarak aktif olan kadınlarda gözlenir. 30-50 yaş arası görülme sıklığı %10'lara, 50 yaş sonrası görülme sıklığı ise %5'e kadar düşmektedir [22, 23].

Dünya genelinde kadınlar arasında HPV enfeksiyonu populasyon prevalansı tahminen %2 ile %44 arasında değişmektedir. Genital HPV enfeksiyonunun insidans ve prevalans tahminleri; çalışılan populasyonun özellikleri, çalışma dizaynı, örnek toplama ve kullanılan HPV tespit yöntemlerine göre değişir. Yüksek prevalans grupları hayat kadınları ve HIV (Human Immun Deficiency Virus) enfekte hastalardır. Klinik olarak sigillere dayanan çalışmaların tipik olarak prevalansları düşük iken; en yüksek prevalanslar HPV DNA tespiti için PCR'a dayalı yöntemleri kullanan çalışmalarda bildirilmiştir. Cinsel olarak aktif kadınlarda prevalans en yüksek, cinsel ilişkiye girmemiş olduğunu söyleyen kadınlar arasında ise en düşük olarak saptanmıştır. HPV enfeksiyonlarının insidans ve prevalansı, HPV DNA ve serum antikorları tespit yöntemlerini kullanan epidemiyolojik çalışmalarla belirlenir [16, 24, 25].

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2010 yılı verilerine göre dünya genelinde kadınlar arasında HPV prevalansı %11.4 olarak bildirilmekle birlikte bu oran gelişmekte olan ülkelerde %14'e kadar çıkmaktadır. Türkiye'de 15 yaş ve üzerinde HPV enfeksiyonu riski olan 25.830.000 kadın olduğu tahmin edilmektedir, ancak yine de HPV prevalansının oldukça düşük (%1.5) olduğu bildirilmiştir. Bu düşük oran ülkemizde HPV ile ilişkili verilerin yetersizliğine bağlı olabilir [21].

Kuzey Yunanistan'da jinekoloji kliniğine başvuran kadınlarda %2.5, İspanya Barselona'da popülasyona dayalı yapılan çalışmalarda %3, Tayland, Songla'da %3.9 gibi düşük prevalans oranları bildirilmiştir. Oysa ki Atlanta'da adolesan kliniğine başvuran 12-19 yaş kadınlar arasında %64, ABD'de 13-18 yaş arası HIV pozitif kadınlarda %77 gibi yüksek prevalans oranları bildirilmiştir. Geniş vaka-kontrol çalışmalarında servikal neoplazi prevalans oranları İspanya'da %5'ten New Mexico'da %42'ye kadar değişmektedir. En yaygın enfeksiyonlar yüksek riskli HPV tipleri ile meydana gelir ve enfekte kadınlarda multiple HPV tipleri ile enfeksiyon oranı %5-30 arasındadır. Tablo 2.1'de çeşitli bölgelerdeki HPV enfeksiyon prevalansı görülmektedir [25, 26].

Tablo 2.1. Bölgelere göre HPV prevalansı

Bölge	Yaş grupları						Toplam (no)	Tek HPV (%)	Multiple HPV		Toplam HPV (%)
	15-24 (no)	25-34 (no)	35-44 (no)	45-54 (no)	55-64 (no)	65-74 (no)			2 (%)	≥3(%)	
Afrika	113	174	125	172	151	91	826	16.5	5	3.3	24.7
Asya	796	1578	1331	1037	881	477	6100	6.3	3.2	0.6	8.2
Güney Amerika	669	1088	871	442	322	154	3546	9.4	2.8	1.6	13.9
Avrupa	176	795	1379	1505	1064	222	5141	3.7	0.7	0.2	4.5
Kuzey Amerika	73	70	70	41	21	9	284	12.5	5.3	3.5	21.1
Tüm bölgeler	1827	3805	3776	3197	2439	953	15897	6.8	2.4	0.9	9.4

Hastalık subklinik veya asemptomatik enfeksiyonlardan benign siğillere ve anogenital kanserlere kadar değişen geniş bir klinik spektruma sahiptir. Çoğu HPV enfeksiyonu kendiliğinden gerilemekle birlikte, nadiren kalıcı hale dönüşebilir ve bu durum malignite gelişimi açısından önemli bir risk faktörüdür [22].

HPV enfeksiyonunun tüm kanserlerin %4'ünden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Serviksin skuamöz hücreli kanserlerinin ise %99'unda HPV DNA tanımlanmıştır. Buna karşın bu oran anal kanserde %90, vulvar kanserde %40, penil kanserde %40 ve orofarenks kanserlerinde %12'lerdedir [7].

Hem sitolojisi normal kadınlar arasında hem de servikal lezyonu olan olgularda en sık rastlanan genotip olan HPV tip 16 en büyük onkojenik potansiyeli taşıyan tiptir. Servikal lezyonlarda HPV tip 16 %50-60 oranında saptanırken, HPV tip 18 %10-12 oranında bulunmaktadır. HPV tip 16 ve HPV tip 18, tüm ülkelerde invaziv servikal kanserlerin %70'inden sorumludur. Dünya genelinde ortalama onkojenik HPV prevalansı %15.1 iken; 30 yaş ve üstü kadınlarda ortalama onkojenik HPV prevalansı %9.2'dir [6, 21, 27].

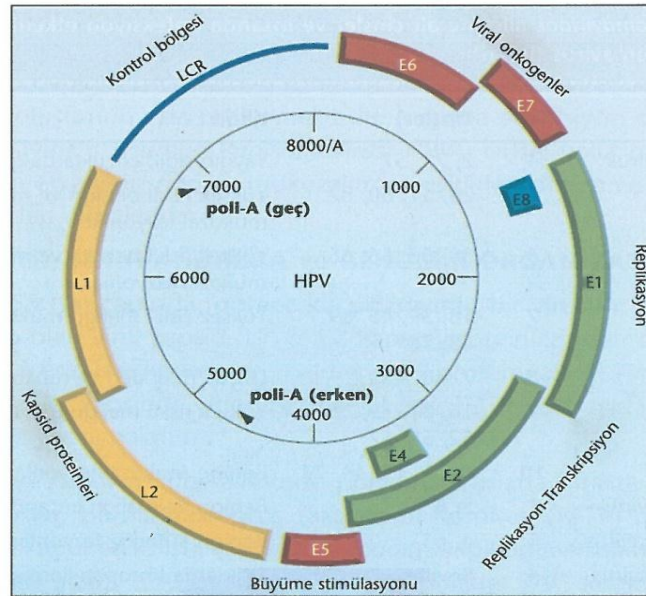
Servikal kanser, bütün dünyada, kadınlarda meme kanserinden sonra görülen ikinci en yaygın kanserdir. Servikal kanser, prekanseröz lezyonların tespiti ve tedavisi ile büyük oranda (>%90) önlenilebilir bir hastalıktır. Erken tanı etkilidir, çünkü prekanseröz lezyonlar invaziv kansere çok yavaş, genellikle 10 yıldan uzun bir sürede ilerlerler. Servikal kanser vakalarının %80'i servikal kanser tarama programlarının etkili bir şekilde yapılmadığı veya uygulanamadığı gelişmekte olan ülkelerde görülür. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 500.000 yeni servikal kanser vakası saptanırken, bunların 270.000'den fazlası bu hastalıktan kaybedilmektedir. Bu

ölümlerin %83'ü gelişmekte olan ülkelerde olmaktadır. Bu veriler serviks kanserinin görülme sıklığını ve bu kanserden ölüm oranlarını azaltmakta tarama programlarının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir [10, 27, 28].

### 2.3.Virus Yapısı ve Genel Özellikleri

HPV *Papillomaviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan zarfsız, 45-55 nm çapında ikozahedral kapsidi olan, yaklaşık 8000 bp uzunluğunda sirküler çift sarmallı bir DNA virusudur. Kapsidi protein yapıda olup yapısı elektron mikroskopik olarak 12 penton ve 60 hekzon olmak üzere toplam 72 adet kapsomerden oluşmuştur. Viral DNA virion ağırlığının yaklaşık olarak % 12'sini oluşturur [29, 30].

Virion iki kapsid proteini içerir. Majör kapsid proteini 55 kDa molekül ağırlığında olup virion ağırlığının %80'ini oluşturur ve minör kapsid proteini ise 70 kDa'dur. Majör kapsid proteini HPV cinsine özgü ve bütün HPV tipleri için ortak olan antijeniteye sahiptir [31].



Şekil 2.2. Human papillomavirus genom yapısı

Viral proteinleri kodlayan dizinler tek bir DNA sarmalı üzerindedir ve genetik yapı tüm papillomaviruslarda aynıdır. Viral genom, 3 majör bölgeye bölünmüştür ve sekiz adet okuma bölgesi (ORF: Open reading frames; genomun bitiş kodunu olmayan ve transkripsiyonda önemli rol oynayan kısımlarına denir) içerir.

Viral genler, enfeksiyon esnasında ne zaman eksprese edildiklerine bağlı olarak; sekiz adet yapısal olmayan “erken” protein (early, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8) ve iki adet yapısal “geç” protein (late, L1 ve L2) sentezler. Erken ve geç bölge arasında replikasyon orjinini içeren 1000 bç’lik uzun kontrol bölgesi (long control region, LCR) bulunur. Bu bölge “non-coding” (protein kodlamaz) veya “upstream regulatory region” (URR) olarak da bilinir. Kontrol bölgesi içerisinde; transkripsiyonu kontrol eden diziler, erken proteinlerde ortak olan N terminal dizileri ve replikasyon orijini yer almaktadır. Tüm papillomaviruslarda üç bölge iki polyadenylation (pA) bölge tarafından ayrılır. Erken bölge viral genomun %50’den fazlasını, geç bölge %40’ını ve LCR %5’ini oluşturur. ORF’ler tek bir DNA sarmalında mRNA transkripsiyonu ile eksprese edilirler. Transkripsiyonun regülasyonunda görev alırlar. DNA replikasyonunu ve hücrel transformasyonu düzenlerler (Şekil 2.1) [1, 8, 15].

Erken bölge yaklaşık 4000 bç uzunluğundadır. Viral replikasyon, transkripsiyon işlevlerini kontrol eder ve hücrel transformasyondan sorumlu proteinleri kodlar. Bunlardan E1 ve E2’nin DNA replikasyonunda rol oynadıkları, ayrıca E2’nin, birer onkoprotein olan E6 ve E7’yi baskılayıcı aktivite gösterdiği belirlenmiştir; E4 bölgesi sitoskeletonun değişiminden, E5 ise transformasyon aktivitesine sahip membran proteininin sentezinden sorumlu ürünlerdir. E3 ve E8’in etkinlikleri kesinlik kazanmamıştır. Geç bölge DNA’yı saran viral kapsid proteinlerinin sentezlendiği bölgedir. Tüm papillomaviruslarda geç bölgede L1 ve L2 denilen iki ORF mevcuttur. Korunmuş bölge olan L1, major kapsül proteininin (kapsülün %95’i) sentezinden sorumludur. Anti-kapsül antikoları, bu proteine karşı hazırlanmaktadır. L2 minör kapsid proteinidir ve HPV tipleri arasında farklılık gösterir. Tiplerin antijenitesindeki farklılıkları meydana getirir [8, 15].

#### 2.4.Sınıflandırma

İnsan dahil birçok memeli türünü enfekte eden papillomaviruslar taksonomik olarak polyomaviruslardan ayrı, *Papillomaviridae* ailesinde sınıflandırılmıştır [8].

Önceden elektron mikroskopisi ile yapılan çalışmalarda papillomaviruslar ve polyomaviruslar arasındaki ilişki araştırılmış ve ortak karakteristik özelliklerine dayanılarak her iki grup *Papovaviridae* ailesi içinde birleştirilmiştir. Ancak yapılan birçok çalışma bu iki grubun doğasının daha iyi anlaşılması için yol göstermiştir.

Papillomaviruslar, polyomaviruslar ile fiziksel ve kimyasal olarak ortak özellikleri paylaşmasına karşılık temel biyolojik özellikleri ve genomik organizasyonları farklıdır. Bu sebeple yakın geçmişte Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (International Council on Taxonomy of Viruses (ICTV)) tarafından *Polyomaviridae* ve *Papillomaviridae* olarak iki ayrı aile içinde sınıflandırılmışlardır [32].

Papillomavirusların tiplendirilmesi, genomundaki farklılıklara göre yapılmıştır. Bu nedenle tipler serotip yerine "genotip" olarak adlandırılmakta ve tip sayısı hızla artmaktadır. Papillomavirus dizi veritabanlarının analizi majör kapsid proteinini kodlayan L1 geninin çok iyi korunmuş olduğunu, bu nedenle ailenin sınıflandırılması için uygun olduğunu göstermiştir. Bu sebeple tip, alttip ve varyantların taksonomik ayrımında L1 kapsid gen bölgesinin sekans farklılıklarından yararlanır. Yeni bir HPV tipinin tanımlanması için bilinen tüm tiplere göre L1 dizisinde %10'dan fazla nükleotid farkı (ya da %90'dan az sıra homolojisi) gerekir. Her bir HPV genotipi keşif sırasına göre numaralandırılır. Şimdiki veriler 200'den fazla HPV tipinin varlığını desteklemektedir ve muhtemelen henüz tanınmamış yeni tipler vardır. Subtip tanımı ise ilk olarak 1980'de restriksiyon paternlerindeki farklılıklara dayanarak kullanılmıştır. HPV genomunun L1 genindeki %2-10 arası farklılık subtipleri belirler. Şimdilik sadece HPV 5, 8, 20, 34, 44, 54, 68 ve 82'nin subtipleri bilinmektedir. Aynı tip izolatların L1 gen nükleotid dizilerinde %2'den daha az farklılıklar ise "varyant" olarak isimlendirilir. HPV varyantlarının kodlanmayan LCR bölgesinde %5 ve daha fazla intratipik ayrılık vardır. Bazı çalışmalarda her viral tip için yaygın varyantların sadece sınırlı sayıda olduğu görülmüştür ve etnik grupların kendi aralarında gelişen varyantlar da büyük farklılıklar gösterir. Örneğin Amerika'daki Hintliler ve Afrikalılardaki bu varyantların kimyasal, biyolojik ve patojenik özellikleri değişir ve HPV varyantları L1, L2 ve LCR bölgelerindeki nükleotid farklılıklarına dayanarak European (E), Asiatic (AS), Asiatic American (AA), African AF1 ve AF2 olmak üzere beş büyük gruba ayrılmıştır. Bu varyant grupları arasında E2, E4, E5, E6, E7 genlerinde bazı dizi varyasyonları da bulunmuştur. Farklı veriler farklı varyasyonlar arasındaki korelasyonu ve neoplazi için yüksek riski desteklemektedir [5, 31, 33].

Günümüzde doku tropizmi, onkojenik potansiyel ve filogenetik farklılıklar gösteren 200'ü aşkın sayıda HPV genotipi tanımlanmıştır. Farklı genotipler, virusun

öncelikli enfekte ettiği epitelyum hücrelerinin tipine bağlı olarak, farklı doku tropizmi gösterir: kutanöz veya mukozal tipler. Kutaneotropik tipleri (HPV tip 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 ve 65) kutanöz ve plantar siğillerden izole edilmiştir. Mukozotropik olan HPV grubu ise (HPV tip 6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 73) her iki cinsiyette anogenital bölgede benign ve malign lezyonlardan izole edilmiştir [5, 34].

Genital epitelyumu enfekte eden ve çeşitli klinik belirtilere sebep olan yaklaşık 60 HPV genotipi vardır. Onkojenik potansiyel açısından HPV genotipleri yüksek riskli, muhtemel yüksek riskli ve düşük riskli genotipler olmak üzere üç grupta incelenir (Tablo 2.2). Yüksek riskli genotipler servikal, vajinal, vulvar, anal, penil, oral, baş ve boyun kanserlerinin gelişiminde rol oynarken, düşük riskli grup çoğunlukla anogenital bölge siğillerinden sorumludur. Onkojenik HPV tipleri ile oluşan enfeksiyonlar bütün HPV enfeksiyonlarının %50-75'ini oluşturur. Yüksek riskli HPV tipleri olan tip 16 ve 18, tüm dünyada en sık saptanan tiplerdir [6, 7, 25, 29].

Tablo 2.2. Onkojenik risk potansiyellerine göre HPV'lerin gruplandırılması

<b>Risk sınıflaması</b>	<b>HPV tipleri</b>
Yüksek risk	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Muhtemel yüksek risk	26, 53, 66
Düşük risk	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Filogenetik olarak bağlantılı insan papillomavirusları benzer biyolojik özelliklere sahiptir. HPV 16 serviksi en yaygın enfekte eden virustur, invaziv kanser ve intraepitelyal neoplaziler ile ilişkisi oldukça güçlüdür. HPV 16 ile en yakın ilişkili tipler; tip 31, 33, 35, 52, 58 ve 67'dir. HPV 18'in nonskuamöz servikal kanserler ile ilişkisi daha güçlü olsa da, skuamöz lezyonlarda da yaygın olarak bulunmaktadır. HPV 18 ile ilişkili tipler; tip 39, 45, 59, 68, 70 ve 85'tir. Son epidemiyolojik çalışmalar daha önce düşük riskli olarak kabul edilen tip 26, 53 ve 66'nın aslında yüksek riskli olabileceği tartışmalarını başlatmıştır. Benzer mukozal virusların çoğu farklı mukozal bölgelerde morfolojik olarak benzer lezyonlara sebep olurlar. Nitekim, biyolojik ve patolojik olarak kondilomaya benzeyen laringeal ve konjunktival papillomların en



sık nedeni HPV 6 ve 11'dir. Buna karşın, oral kavite, anüs, penis ve vulvanın Bowenoid displazisi sıklıkla HPV 16 ile ilişkilidir [35].

Şu anda bilinen insan ve hayvan papillomavirusları, Yunan harfleri ile belirtilen 16 cinsi oluşturur. Bu cinslerin beşi, sadece HPV tiplerinden ve bazı maymunlardan izole edilen papillomavirus tiplerinden oluşur. Bütün diğer cinsler, çeşitli memeli ve kuşlarda bulunan tipleri içerir. Klinik yönden en önemli cins, alfa PV'tür. Bu cins, mukozal ve genital lezyonlarla ilişkili tüm HPV tiplerini içerir. Genomik dizileri temel alınarak, bütün HPV tipleri alfa papillomavirus cinsi içinde 15 türü oluşturur. 15 HPV türünün 12'si son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarla yüksek risk olarak sınıflandırılmıştır. Servikal kanser oluşumu ile ilişkili iki türün HPV-tür 7 (HPV tip 18, HPV tip 39, HPV tip 45, HPV tip 59 ve HPV tip 68) ve HPV-tür 9 (HPV tip 16, HPV tip 31, HP tip 33, HPV tip 35, HPV tip 52, HPV tip 58 ve HPV tip 67 ) oldukları gösterilmiştir (Tablo 2.3) [5, 35, 36].

Tablo 2.3. İnsanda enfeksiyon oluşturan HPV tipleri ve ilişkili hastalıklar

Hastalık	HPV tipi
Plantar siğil	<b>1, 2, 4, 63</b>
Yaygın siğil (common wart)	<b>1, 2, 3, 4, 7, 10, 26, 27, 28, 29, 41, 57, 65, 77</b>
Basık siğil (flat wart)	<b>3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76</b>
Diğer deri lezyonları (epidermod kist vb.)	<b>6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73</b>
Epidermodysplasia verruciformis	<b>2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50</b>
Tekrarlayan respiratuvar papillomatozis	<b>6, 11</b>
Fokal epitelyal hiperplazi (Heck hastalığı)	<b>13, 32</b>
Konjunktival papillom/karsinomlar	<b>6, 11, 16</b>
Anogenital siğiller (kondiloma akuminata)	<b>6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70</b>
Servikal intraepitelyal neoplazi	<b>6, 11, 16, 18, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66</b>
Servikal karsinom	<b>16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70</b>

\* En sık saptanan tipler koyu olarak belirtilmiştir

## 2.5.Patogenez

Papillomaviruslar, derinin yassı epitelyum hücrelerini (siğiller) ve mukoz membranları (genital, oral ve konjuktival papillomalar) enfekte edip replike olarak, çeşitli lezyonlara sebep olurlar. Epitelyotropik viruslardır ve skuamöz hücrelerin nukleusunda çoğalırlar. HPV tipleri dokuya özgüdürler ve her biri spesifik epitellerde enfeksiyon ile ilişkidir [1, 38].

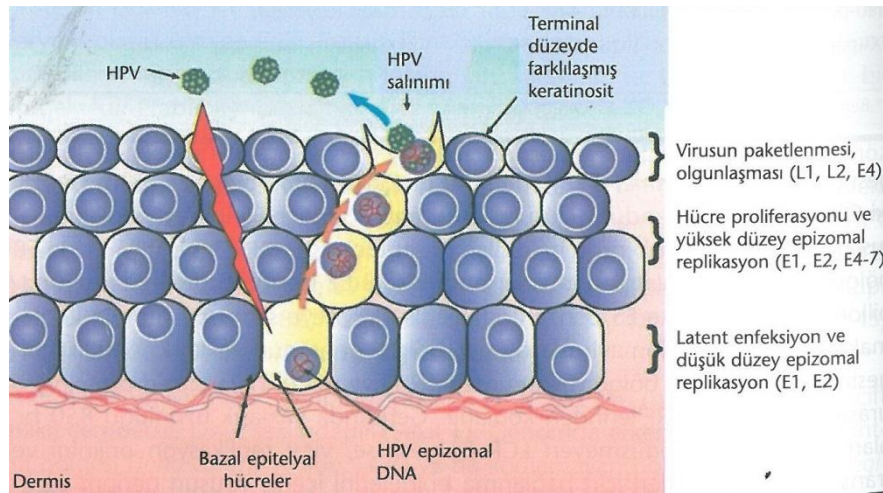
HPV'nin doku üzerindeki etkileri başlıca üç değişik enfeksiyon türü olarak görülmektedir. Bunlar; latent enfeksiyon, prodüktif ve nonprodüktif enfeksiyonlardır. Latent enfeksiyon safhası çok sayıda virus partikülünün epitelyal çatlaklar yoluyla bazal hücrelere ulaşması ve hücreleri enfekte etmesi aşamasını içerir. Bu aşamada virus genomu hücre içinde ayrı bir sirküler DNA fragmanı (episom) olarak yer almaktadır. Bu dönemde enfekte hücreler histolojik olarak tespit edilemez [39].

Birkaç hafta ile yıllar arasında değişen bir inkübasyon periyodu sonrasında viral replikasyon başlar. Hücrelerde karakteristik koilositoz lezyonu görülürken, papillomatöz çıkıntılar kondilom adı verilen lezyonları meydana getirir. Bu kondilomlar çıplak gözle görülebilen overt lezyonlar olabildiği gibi, sadece kolposkopi ile görülebilen subklinik enfeksiyonlar da olabilir. Kondilom lezyonları vulva, vajina ve servikse yerleşebilir, bazen dev bir boyuta ulaşabilir (Buscke-Lowenstein tümörü). Kondilom lezyonlarında daha çok HPV 6 ve 11 tespit edilir. Yüksek onkojenik potansiyelli HPV tipleriyle enfeksiyonda enfekte hücreler diferansiye olamaz ve viral siklusun tamamlanabilmesi mümkün olmaz. Bu safhada yüksek dereceli displazi ve invaziv kansere kadar ilerleyen neoplastik değişimler görülür. HPV ile temas sonrası hangi tür enfeksiyonun gelişeceği birçok kofaktörün etkisine bağlıdır, çünkü tüm HPV enfeksiyonlarının sadece % 10 kadarı kondiloma olarak klinik belirti verirken, % 1'den az bir kısmı ise neoplastik değişikliklere ilerler [39].

HPV enfeksiyonlarının çoğu geçici ve asemptomatiktir ve klinik belirtilere sebep olmaz. Yeni HPV enfeksiyonlarının %70'i 1 yıl içinde ve %90'ı 2 yıl içinde temizlenir. Yeni enfeksiyonların ortalama süresi 12 aydır. Yüksek riskli HPV tipleriyle persistan enfeksiyon servikal kanser öncü lezyonları ve invaziv servikal kanser için en önemli risk faktörüdür. HPV'nin onkojenik özelliğinin ortaya

çıkmasında, yüksek risk taşıyan (veya onkojenik) suşların nükleik asitlerini konak genomuna entegre etmeleri söz konusudur; ancak son çalışmalarla “entegrasyon” konusunun onkojen özelliğın ortaya çıkmasında mutlak bir zorunluluk olmadığı; epizomal yerleşim varlığında da, bu özelliğın oluşabileceğı belirlenmiştir. HPV tiplerinin prekanseröz lezyonlara progresyonu ve persistanlık için risk diğerk yüksek risk HPV tiplerine göre HPV 16 ile daha fazladır. İlk HPV enfeksiyonu ve servikal kanser gelişimi arasındaki süre genellikle 10-15 yıldır [8, 40].

HPV enfeksiyonu sonrasında kanser gelişimine kadar olan her safha geri dönüşümlüdür. Bu sırada progresyonu hızlandıracak olan faktörler regresyonu yavaşlatacak, regresyonu hızlandıracak olanlar da progresyonu engelleyecektir. Schlecht ve arkadaşlarının sitolojik zeminde yapmış oldukları ve 20404 kadını 4-6 aylık aralarla sekiz yıllık periyotta inceledikleri çalışmada HPV tipinin (onkojenik tipte progresyon daha hızlı), yaşın (yaşla progresyon artmakta), prekanseröz lezyonun şiddetinin (lezyonun şiddeti arttıkça progresyon hızlanmakta) progresyon ve regresyon ile ilgili olduğú gösterilmiştir [41].



Şekil 2.2. Bazal tabaka hücrelerinin enfeksiyonu ve HPV replikasyonu

Enfeksiyonun klinik seyrini belirleyen HPV'nin hücre düzeyindeki etki mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak, ajanın konağaya yerleşebilmesi ve enfeksiyon oluşturabilmesi konak hücresinin diferansiyasyon yeteneğı, yani reproduktif kapasitesi ile doğrudan ilişkilidir. Normalde servikal epitelin üst tabakasında nükleus yoktur ve hücre bölünmez. Buna karşın suprabazal tabakada

devamlı olarak bölünme yeteneğine sahip undiferansiye hücreler bulunmaktadır ve bu nedenle enfekte olacak olan hücreler bu tabakadadır. Papillomaviruslar tarafından enfeksiyon oluşması, virus partiküllerinin bazal tabaka epitel hücrelerine bağlanmasını ve bölünen bazal hücrelere girişini gerektirir. Bunun su veya çevresel faktörler ile aşınmış veya mikrotravmalar gibi şartlar altında olabileceği düşünülmüştür. Genital bölge bazal membran tabakasında yer alan epitel hücrelerinin enfekte olmasıyla başlayan replikasyon döngüsü, hücre tabakaları arasında yukarıya doğru ilerleyerek gerçekleşir (Şekil 2.2) [5, 7, 38, 42].

Suprabazal tabakaya ulaşan HPV'nin hücrelere nasıl girdiği bilinmemektedir. HPV'nin bazal keratinositlere bağlanmasında rol oynayan reseptörler konusu henüz netlik kazanmamıştır. Ancak  $\alpha 6$  integrinlerin, heparin ve yüzey glikozaminoglikanların reseptör olarak kullanıldığına dair bulgular mevcuttur. Reseptöre bağlanan etken, klatriine bağımlı yoldan endositoz uyarınca konak hücreye giriş yapar. Bu aşamada virusun önce reseptörüne tutunduğuna; sonraki aşamada konformasyonel değişime uğradığına ve sonuçta hücre içine entegre oluşuna ait farklı modeller tanımlanmıştır [8].

Papillomavirus partikülleri geç endozomlarda ve/veya lizozomlarda ayrışır ve viral DNA'nın nukleusa transferini minör kapsid proteini L2 kolaylaştırır. Hücre nukleusuna giren virusun tek zinciri konağın DNA'sına tutunur. Sonrasında önce viral DNA, daha sonraki süreçte kapsid sentezlenir. Enfekte hücreler hücre başına 20-100 viral genom sentezlenmesine aracı olur. Replikasyon sürecinde öncelikle yapısal olmayan E1, E2, E6 ve E7 proteinleri sentezlenir. Bu ürünlerin regülatör özellikleri uyarınca ilerleyen aşamalarda diğer "early" proteinler sentezlenir ve nihayet L1 ve L2 kapsid proteinlerinin oluşumuyla yeni virionların sentezi tamamlanır. Süreç devam ederken, integrasyon sonucu aşırı üretimleri gerçekleşen E6 ve E7 proteinlerinin, p53 ve retinoblastoma (pRb) gibi tümör süpresör genleri yıkıma uğratarak ve telomeraz etkisiyle oynayarak onkojenik etki gösterirler. HPV onkogenleri ayrıca hücre metilasyon mekanizmasını aktive ederek epigenetik değişimlerde ve sonuçta karsinogenezisin başlamasında rol oynar [7, 8, 43].

Hücreler bölündükçe enfekte hücreler dokunun üst tabakasına çıkar. Enfekte olan servikte normalden farklı olarak suprabazal tabakanın üzerindeki hücrelerde de (diferansiye hücreler) nukleusun bulunduğu ve buna HPV'nin neden olduğu

bilinmektedir. Üst tabakalardaki hücrelerde, geç proteinler (L1, L2) sayesinde viral genomların kapsidleri sentezlenir ve bu viruslar skuamöz epitelin dökülmesi ile dokudan ayrılır. Viral DNA onkogenез sürecinin ilk evrelerinde (HGSIL'e (High grade squamous intraepithelial lesion) kadar olan süreçte) epizom şeklinde kalır. Eğer süreç ilerleyecek olursa bu viral epizomal DNA'lar tekrar konak DNA'ya bağlanır (HSIL ve ileri lezyonlardaki durum). Bu bağlanma genellikle konak hücre DNA'sının kırılğan bölgelerinin yakınına olur. Konak DNA'sına bağlanma sürecin malign transformasyona gidişinin başladığı şeklinde yorumlanmaktadır. Bağlanma sonrasında tümoral patogeneze olması gereken immortalizasyon ve genomik instabilite gerçekleşir. Hücre düzeyindeki bu değişikliğin viral genomun yapısıyla doğrudan alakalı olduğu bilinmektedir. Viral genom sirküler çift sarmallı DNA molekülüdür ve replikasyondan sorumlu sekiz tane ORF proteinini kodlayacak bölge içermektedir. Bu proteinlerden altısı erken dönem (E1, E2, E4, E5, E6, E7), ikisi geç dönem (L1, L2) proteinleridir. Her bir proteinin replikasyonda önemli görevleri vardır. Özellikle E6 ve E7 proteinleri immotalizasyon ve genomik instabiliteden sorumludur. Bunu tümör süpresor genlerine (başta p53 ve retinoblastom(Rb)) bağlanarak yapmaktadır [7].

## 2.6.İmmünite

Bir virus enfeksiyonunda, erken dönemde devreye giren doğal bağışıklığın yabancı etkeni tanıyarak savunmanın ilk aşamasını oluşturduğu; ayrıca sonraki aşamada görev alacak olan edinsel bağışıklık elemanlarından T ve B lenfositlerine antijen sunumu yaparak aktivasyonlarında rol oynadığı bilinmektedir. Enfekte olması sonrasında değişime ya da yıkıma uğrayan bir hücre tarafından aktive edilen doğal bağışıklık, inflamasyon sürecini başlatır. Bu aşamada doğal bağışıklığın çözünmüş ya da hücresel elemanları devreye girer. Böylece hem inflamatuvar sitokinler ve diğer efektör moleküller üretilmeye başlanır; hem de dentritik hücreler gibi doğal bağışıklığın bazı elemanları antijenin yardımcı T lenfositlerine (Th; CD4+ hücreler) sunumunu gerçekleştirerek edinsel yanıtı uyarır. Bu gelişme sırasında antijenin özelliklerine göre en etkili efektör yanıt tipi belirlenir ve edinsel bağışıklığın tip 1 ya da 2 yönünde gelişiminin önü açılır. Doğal bağışıklık hücrelerinin "Toll like reseptörler" (TLR) gibi reseptörleriyle, virus ya da enfekte hücre yüzeyindeki özel bölgeleri tanımasıyla doğal bağışıklığın aktivasyonu ve uygun edinsel yanıtın

uyarılma süreci başlamış olur. HPV enfeksiyonlarında da, immün yanıtın özellikleri, genel anlamda bir viral enfeksiyon sırasında etkene karşı oluşacak olan yanıtın niteliklerine benzemektedir [8].

HPV enfeksiyonlarında, etkenin replikasyon süreci hedef hücrelerin farklılaşma dinamiği ile paralel gider ve virusların çoğalması keratinositlerin olgunlaşmasıyla bağlantılıdır. HPV'lerin bazal keratinositleri enfekte etmeleriyle başlayan viral proteinlerin sentez süreci öncelikle az sayıda E1, E2, E6 ve E7 gibi ürünlerin oluşumu; daha sonra diğer "early" genlerin ve nihayet L1 ve L2 gen ürünlerinin senteziyle devam eder. Son aşamada farklı viral partiküllerin bir araya gelmesiyle ortaya çıkan yeni virus partikülleri skuamöz epitelyum yüzeyinden ortama salınır [8].

Bu süreçte sitoliz ve sitopatik hücre ölümü söz konusu değildir ve HPV enfeksiyonlarında viremi gerçekleşmez. Buna bağlı olarak da inflamasyona yol açacak güçlü sinyallerin oluşumu söz konusu değildir ve sonuçta istenen düzeyde bir immün sistem uyarısı ortaya çıkmamaktadır. Bu duruma rağmen enfekte bireylerin genelinde, oluşacak hücrel ve hümorale yanıtın, virusun eliminasyonunda başarılı olduğu; CD8+ T hücrelerinin enfekte hücreleri temizlediği, nötralizan antikorların ise serbest virus partiküllerini devre dışı bıraktığı kabul edilir [8].

Bir çsDNA virusu olan HPV'ye karşı doğal bağışıklığın uyarılması, antijen sunan hücrelerden (ASH) dendritik hücrelerin ve Langerhans hücrelerinin TLR'ler (özellikle TLR-9) üzerinden aktivasyonu ile başlar. Reseptör-ligand etkileşimi sonucunda proinflamatuvar sitokinler sentezlenir ve sonuçta edinsel bağışıklık devreye girer. Bu aşamada aktive olan ASH'ler lenf nodüllerine göç ederek antijeni Th lenfositlerine sunar ve harekete geçen efektör hücreler enfeksiyon bölgesine giderek enfekte keratinositleri yıkıma uğratar [8].

Her ne kadar yukarıda özetlenen biçimde etkili bir immün yanıt sonucu virusun yıkımı söz konusu olabilse de, enfekte bireylerin küçük bir bölümünde, immün yanıtın yetersiz kaldığı ve sonuçta yüksek titrede HPV DNA replikasyonu ile karakterize persistan enfeksiyonun geliştiği gözlenir.

Kalıcı bir HPV enfeksiyonunda immün sistemin hangi aşamalarının aksadığı ve yetersiz kaldığı, etkenin hangi mekanizmalarla immün yanıtı kaçabildiği incelenmiş ve bir dizi neden ileri sürülmüştür. Örneğin;

1) HPV replikasyonu sırasında hücre ölümü gerçekleşmediğinden güçlü uyarı sağlanamaz ve buna bağlı olarak ASH'lerin aktivasyonu için gerekli olan yeterli proinflamatuvar sitokin sentezi oluşmaz. Ayrıca intraepitelial ortamda güçlü antijen sunumu görevini üstlenmiş olan Langerhans hücrelerinin E-kadherin gibi adezyon moleküllerinin devre dışı kalmaları nedeniyle işlevlerini gerçekleştiremedikleri gösterilmiştir [8].

2) Viral enfeksiyonların temizlenmesinde, hücreler arası diyalogu sağlayan ve immünkompetan hücrelerin aktivasyon görevini üstlenmiş olan çeşitli sitokinlerin ve kemokinlerin önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Ancak HPV'nin bir dizi proinflamatuvar sitokin, kemokin ve antiviral proteinlerin ekspresyonlarını baskılayarak immün yanıtı aksattığı belirlenmiştir. Örneğin antiviral immünitinin önemli parametrelerinden olan IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$  üretiminin, özellikle yüksek risk HPV tiplerinin (HPV-16 gibi) E6 ve E7 onkoproteinlerince baskılandığı gösterilmiştir [8].

3) Ayrıca, servikal neoplazi durumlarında, Langerhans hücrelerinin işlevlerini düzenleyen TNF ve IL-10'un, virusun yararına olacak oranlarda sentezlendikleri; bu tip patolojilerde artan IL-10 ve azalan TNF düzeylerinin, etkenin hücrel yanıtı kaçmasına yardımcı olduğu saptanmıştır. Benzer biçimde CXL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-15 düzeyleri persistan HPV enfeksiyonlarında azalmakta; IL-2, IL-4 ve IL-12 p40 düzeyleri CIN gelişiminde değişime uğramakta; immünstimulan bir sitokin olan IL-18, HPV-16'nın E6 onkogeni tarafından baskılanmaktadır [8].

4) ASH'lerin uyarılmasında ilk basamak olan TLR-9'un ekspresyonunun yine E6 ve E7 onkoproteinlerince baskılanması sonucunda proinflamatuvar genlerin yeterli uyarısı gerçekleşmez; öyle ki TLR-7 ve TLR-9 sinyalizasyonunun aksamasının kronik enfeksiyondan kanserleşmeye giden süreçte önemli bir parametre olduğu saptanmıştır [8].

5) Edinsel yanıt parametreleri incelendiğinde ise onkojenik HPV enfeksiyonlarında; hem tip 1 hem de tip 2 yanıtını düzenleyen sitokin üretiminin yetersiz düzeyde olduğu; antikor üretiminin fazla gerçekleşmediği; özellikle sitotoksik T lenfositlerine antijen sunumu için gerekli olan, enfekte hücre içindeki TAP-1 aşamasının E7 onkoproteinlerince bozulduğu gösterilmiştir. Ayrıca neoplazilerde sık rastlanan mutasyonlar MHC (major histocompatibility complex)

moleküllerini de kapsamaktadır ve tümör hücreleri bu yoldan da kendilerini sitotoksik T hücrelerinden kaçırabilir [8].

6) Bunlara ilave olarak, immün yanıtı denetleyen Treg hücrelerinin aşırı miktarlarda üretilmelerinin, henüz görevini tamamlamamış edinsel yanıtın devre dışı kalmasına neden olduğu ve böylece servikal lezyonlarda onkojenik HPV enfeksiyonunun temizlenmesini engellediği saptanmıştır. Son olarak tümör bölgelerindeki makrofajlarca üretilen IL-10'nun Treg indüksiyonuna yol açtığı ve aşırı IL-10 varlığının bu yoldan da tümör gelişimini kamçilediği gösterilmiştir [8].

7) Nihayet bir dizi epigenetik faktörün, HPV'nin immün sistemden kaçmasında etkili olduğu saptanmıştır. Örneğin; antiviral genlerin aşırı metilasyonu bu tip bir gelişmeye örnek olarak verilebilir [8].

HPV etkili bir şekilde konak defansını engellemesine rağmen, genital HPV enfeksiyonuna karşı birçok kişide başarılı bir immun cevap gelişir. Güçlü, lokal hücresele immun cevap, serum nötralizan antikorlarının üretimi ve lezyonun gerilemesi ile sonuçlanır. Bu antikorlar enfekte bireylerin çoğunda üretilir. Antikor virus partikülünün dış membranındaki L1 kapsid proteinlerine karşı oluşur. Virionun en fazla immun sistemi uyaran epitopu L1 nötralizan epitopudur ve tip spesifiktir [44]

Serum nötralizan antikor seviyeleri doğal enfeksiyon süresince artar, ancak HPV'nin hücre içi patojen olması ve viremi yapmamasından dolayı pik yaptığı dönemde bile çok düşük seviyelerdedir. Düşük antikor titrelerine rağmen koruyuculuk sağlanabilir. IgG kadın genital yolunun majör immunoglobulinidir. Serumda oluşan antikorlar servikal mukus içerisine transüda olur ve virüsü nötralize eder [45].

Kadınlar çok yüksek oranda HPV ile enfekte olmalarına rağmen, immun sistemi normal çoğu hastada enfeksiyon subklinik seyreder veya lezyonlar sınırlı kalır ve serokonversiyon meydana gelir ve HPV DNA kaybolur. Yüksek riskli HPV için bu temizlenme zamanı; örneğin HPV 16'da ortalama 8-16 aydır ve düşük riskli HPV enfeksiyonlarına göre 4-8 ay daha uzundur. Fakat immun sistemi baskılanmış, renal transplantasyon veya HIV ile enfekte hastalarda lezyon hızlı bir şekilde ilerler. Bundan dolayı HPV enfeksiyonunun kontrolü ve kansere ilerleyişinde immun cevap önemli bir rol oynar. HPV enfeksiyonunun uyardığı sistemik ve lokal humoral



immun cevap bazı HPV antijenlerine karşı, IgG ve IgA antikorlarının oluşması ile gösterilir. Örneğin servikal HPV 16 enfeksiyonu bulunan kadınların büyük bir kısmında HPV 16 L1 kapsid proteinine sistemik IgG antikor cevabı oluşur ve virus benzeri partiküller (VLP) antijen gibi kullanılarak ELISA ile tespit edilir. HPV DNA pozitif kadınlarda, HPV 16 VLP'ye karşı oluşan sistemik IgG ve IgA cevabı, kontrol grubundan daha fazladır ve persistan viral enfeksiyon ile ilişkilidir. Tersine HPV 16 E7 proteinine sistemik IgG cevabı servikal intraepitelyal neoplazide viral temizlenme ile ilişkilidir. HPV 16 enfeksiyonu olan kadınlarda HPV 16 VLP spesifik sekretuvar IgA'nın virus nötralizan aktivitesinin gözlenebilmesine rağmen HPV özgül antijenlere karşı oluşan lokal IgA sağlıklı kadınlarda viral temizlenme ile ilişkili değildir. Benzer olarak lokal HPV 16 VLP özgül IgA ve IgG cevabı CIN'li hastalarda viral temizlenme ile ilişkili değildir. HPV 16 kapsid antijenlerine karşı oluşan lokal antikorlar, HPV enfeksiyonunun başlamasından birkaç ay sonra artar ve antikor seviyeleri HPV varlığına bağlıdır. Servikal lezyonlar tedavi edildiğinde serum ve servikal mukus antikor seviyelerinin azaldığı izlenir [15, 46].

## 2.7.HPV Aşıları

Aşılamada amaç enfeksiyon açısından risk altında olduğu düşünülen kişilerin o enfeksiyon etkiyle karşılaşmadan önce aşılanarak hastalığın ortaya çıkmasının engellenmesidir. Günümüzde yüksek risk HPV tiplerinin tüm serviks kanserlerinin %99.7'sinden sorumlu olduğu bilinmektedir. HPV enfeksiyonuna karşı immunizasyonun esas amacı genital kanser insidansını düşürmektir. Aşılama ile yüksek riskli HPV genotiplerine karşı immunité uyarılabilir ve böylece yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyonun önlenmesi sağlanmış olur. Bir diğer hedef immunizasyon ile HPV ilişkili anogenital siğillerin önlenmesidir [14, 22].

HPV aşıları profilaktik ve terapötik aşılar olmak üzere iki gruba ayrılmıştır [45]. HPV'ye karşı geliştirilmesi hedeflenen;

- a. Profilaktik aşılarda henüz etkenle karşılaşmamış bireylerde nötralizan antikorların,
- b. Terapötik aşılarda ise daha önceden enfekte olmuş kişilerde hücresel yanıtın uyarılması amaçlanmıştır [8].

Bugün için FDA (Food and Drug Administration) onayı almış, kullanımda olan iki tip aşı vardır: Gardasil (Merck) ve Cervarix (GSK). Her ikisi de sadece koruyucu aşıdır ve terapötik etkinlikleri yoktur. Amaç HPV bulaşını önlemektir.

**Kuadrivalan HPV Aşısı:** Kuadrivalan HPV aşısı, HPV tip 6, 11, 16, 18'e karşı etkili, Merck SharpDohme firması tarafından geliştirilen ve Gardasil adı ile piyasaya sunulan bir aşıdır. Bu aşı ABD'de Haziran 2006'da FDA tarafından onaylanmıştır. Türkiye'de ise 2007 yılı itibarıyla onay almış ve 9-26 yaş arası kadınlarda kullanılmaya başlanmıştır. Aşı intramusküler (İM) olarak 0, 2 ve 6. aylarda yapılmaktadır. Yapılan faz III çalışmalarında da aşılama sonrası en az 5 yıl etkinliğin sürdüğü gösterilmiştir [22, 47].

**Bivalan HPV Aşısı:** Bivalan HPV aşısı GlaxoSmithKline firması tarafından geliştirilen, HPV tip 16 ve HPV tip 18'e karşı etkili olup Cervarix adı ile piyasaya sürülen bir aşıdır. Mart 2007'de FDA onayı almış, ülkemizde 2008 yılında 15-25 yaş arası kadınlarda kullanılmaya başlanmıştır. Aşı 0, 1 ve 6. ayda toplam üç doz olarak IM yoldan uygulanır. Koruyuculuğu en az 5 yıl devam eder [22].

Aşı, genomu olmayan virusa karşı yani sadece kapsid proteinlerine (L1 proteini) karşı geliştirilmiştir. Aşı için elde edilen ve virus benzeri protein denen protein viral DNA taşımayan, güçlü immünojenik özellikte olan, enfeksiyöz ve onkojenik özelliği olmayan proteindir. Aşılanan kişilerde viral kapsidin çeşitli yapısal hallerini tanıyabilen polispesifik antikor yanıtı oluşmasını sağlar. HPV tip 16 ve HPV tip 18 etiyojide önceliklidir ve Avrupa'daki serviks kanserlerinin %71.5'inden sorumludur. Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'da ise bu oran %80'in üzerindedir. Dolayısı ile aşı mutlaka bu iki subtipi kapsamalıdır. Bunun yanı sıra bu iki yüksek riskli subtipi karşı geliştirilmiş aşı sadece yukarıda bahsedilmiş oranlardaki kadınları korumayacaktır. HPV antikorları tip spesifik olarak gelişmekte ve aşıda kullanılan tipler dışındaki tiplere karşı korunması beklenmemektedir. Ancak mekanizması tam olarak bilinmeyen bir şekilde bivalan aşıyla aşılanan bireylerde HPV tip 31, HPV tip 33 ve HPV tip 45'e karşı da çapraz koruma geliştiği gözlenmiştir. Ancak çapraz korumayla ilgili verilerin uzun dönemde değişiklik gösterdiği ve çapraz korumada düşüş görüldüğü bildirilmiştir [7, 14].

Aşıyla beraber hümmoral ve hüccresel immün sistem aktive edilir ve kanda antikorlar oluşur. Bu antikorlar enfeksiyon bölgesine yani servikse ulaşır. Enfeksiyon

bölgesindeki bu antikörler virüsü nötralize ederek patojenin hücreye girmesini önler. Böylelikle enfeksiyon ajanına karşı aktif korunma sağlanmış olur. Aşıyla beklenen yarar sadece serviks kanserinin önlenmesine yönelik olmayıp, anogenital bölge siğillerinin, vulva ve vajenin prekanseröz lezyonlarının, vulva ve vajina kanserlerinin, penil kanserlerin, orofarengial kanserlerin ve anal kanserlerin aşıyla beraber azaltılabileceği öngörülmektedir [7].

Geliştirilen aşuların uygulanması ve servikal kanser taramaları birlikte yapılmalıdır, çünkü aşular kanser sebebi olan diğer yüksek risk HPV tiplerine karşı (%25-30) koruma sağlamamaktadır. Dolayısıyla erken dönem servikal lezyonların belirlenmesi ve prognozu hala ciddi bir problemdir.

## **2.8.Klinik Belirtiler**

HPV enfeksiyonlarının klinik belirtileri geniş bir spektruma sahiptir; enfeksiyonlar bazen semptomsuz ve benign seyrederken, bazen de tekrarlayıcı ve tedaviye direnç gösteren, sürekli proliferasyon ile giden bir tablo göstermektedir. Bunlardan bazıları kansere dönüşebilir. Değişken klinik tablo, virus tipine (Örneğin; HPV 16 ve 18 invaziv karsinom ile ilişkilidir), lezyon lokalizasyonuna (respiratuvar papillomatozis gibi), bireyin immünolojik durumuna (gebeler ve immün yetmezliği olanlarda daha ağır tablo) ve epitelin doğasına bağlıdır [31].

Hastalığın benign formları arasında en sık görüleni anogenital siğil olup, malign formları arasında en sık görülen ise serviks kanseridir. Bunlar dışında HPV el ve dudaklarda siğillere, nazofarengeal papillomlara, anüs, vulva, vajina ve penis kanserine de neden olmaktadır [21].

### **2.8.1.Anogenital Siğiller**

Genital siğiller klinik olarak cinsel aktif popülasyonun en az %1'inde görülmektedir. Genital siğillerin yaklaşık üçte ikisi enfekte partner ile cinsel ilişki sonucu gelişir. Tam kuluçka süresi bilinmemektedir, fakat çoğu araştırmacı kuluçka süresinin yaklaşık olarak 3 ay olduğunu varsayar. Tüm genital siğillerin %90'ından HPV tip 6 ve 11 sorumludur ve lokal kondilomatöz lezyonlar görülür [48].

### **2.8.2.Vulva-Vaginal Siğiller**

Hastaların yaklaşık %50'si multiple lokalizasyonlarda lezyonlara sahiptir. Siğiller genellikle asemptomatik olmasına ve rutin pelvik muayene sırasında saptanmasına rağmen bazı hastalar kaşıntı, yanma, kanama ve vaginal akıntı şikayetleriyle başvurabilir. Vulvo-vaginal kondilomalarda dispareni (ağrılı cinsel ilişki) oluşabilir ve eğer dev kondilomalar mevcut ise üretra, vagina ve/veya rektumda obstrüktif semptomlar oluşabilir. İmmünsuprese hastalar, büyük, tedaviye cevap vermeyen atipik pigmente lezyonlar ve 40 yaşın üstündeki hastalarda malignensi riski artar [49].

### **2.8.3.Perianal Siğiller**

Vulva-vaginal kondilomalı hastaların yaklaşık %25'inde aynı zamanda perianal kondiloma da mevcuttur. Tipik olarak pembe-kahverengi papüller ve nodüller anüsü seçer. Siğiller tedavi edilmezse birleşerek daha büyük kitle şeklinde rektuma uzanma eğilimindedirler ve bu vakalarda cerrahi tedavi gerekir. Eğer bir partnerde perianal siğil varsa aynı zamanda vulva-vaginal siğil ve penil siğil açısından da kontrol edilmelidir. Perianal siğiller homoseksüel erkeklerde de yaygındır ve HIV gibi hastalıklar açısından da risk altındadırlar [49].

### **2.8.4.Penil Siğiller**

Penil siğiller özellikle glans penis, penil shaft ve prepsiyumu tutar. Meatus ve üretra çok nadir tutulur ve tedavi için büyük bir problem oluşturur. Peniste bu lezyonlar gelişirse HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu düşünülmelidir [49].

### **2.8.5.Epidermodysplasia Verruciformis (EV)**

EV nadir görülen bir hastalık olup kutanöz HPV enfeksiyonlarına duyarlı olan bireylerde rastlanılmaktadır. Çocukluk çağında, genellikle siğiller gelişir, yaygınlaşmaya başlar, sonlanmaya meyilli değildir ve bazı durumlarda skuamoz hücre kanserlerine doğru gelişme mümkündür. Normalde görülen predominant karakterli iki tip lezyon vardır; her ikisinin de aynı hastada gelişmesi mümkündür. Bazı lezyonlar düz siğiller olarak görülebilmektedir, diğer lezyonlar ise kırmızı-kahverengi maküller, pullu veya düz biçimdedir. Düz siğillere sebep olan HPV tipleri genel

populasyonda düz siğilleri meydana getiren tipler ile aynıdır ki bu tipler HPV tip 3 ve HPV tip 10'dur. Pullu yapıdaki siğiller ise EV'ye özgü HPV tipleri ile aynıdır ve yaygın olarak HPV tip 5 ve HPV tip 8 bunlardan birkaçıdır. EV'li hastalar birçok HPV tipi tarafından enfekte edilebilir. EV hastalarının yarısında genetik düzensizlik sonucu meydana gelmektedir. EV otozomal resesif model olarak görülmektedir. Bununla birlikte, bir aile X kromozomu ilişkili resesif bir genetik yapıya sahiptir. Bu lezyonlar klasik tedavi yöntemlerine karşı oldukça dirençlidir ve daha da önemlisi EV'li birçok hastada immün sistem fonksiyon bozuklukları da söz konusudur [50].

### **2.8.6.Genital Olmayan Deri Siğilleri**

Genital olmayan deri siğilleri vücudun herhangi bir yerinde olabilir ve sıklıkla görüldükleri yerler ayak ve ellerdir. Bu siğiller benign papillomalar olup genellikle yaşlı büyük çocuk veya genç yetişkinlerde görülürler. Çevresel şartlara ve kuruluğa karşı dirençli oldukları gösterilmiştir ve geçiş genellikle eşyalar vasıtasıyla veya otoinokülasyon ile olur [51].

### **2.8.7.Servikal Kanser**

Serviks kanseri dünya genelinde kadınlar arasında ikinci sıklıkla görülen kanser türüdür. Prevalansı Pap smear tekniğinin kullanıldığı tarama stratejileriyle belli seviyelere kadar indirilmiş ancak istenilen düzeye çekilememiştir. Gelişmekte olan ülkelerde halen ikinci sıklıkta görülürken, gelişmiş ülkelerde başarılı tarama programlarıyla altıncı hatta bazı ülkelerde onuncu sıraya gerilemiştir. Ne yazık ki kadınların çoğunda servikal kanser tanısında eksiklikler mevcuttur, özellikle gelişmekte olan ülkelerde servikal kanser sebebiyle yılda en az 250 bin kadın ölür [7, 52].

Bugün için yüksek riskli HPV tiplerinin gelişen serviks kanserlerinin %99'undan sorumlu olduğu bilinmektedir. Serviks kanseri ile HPV ilişkisi kanser ile etken ilişkileri içerisinde en yükseğidir. Genital sistemin HPV enfeksiyonu düşük dereceli lezyon olarak başlayıp kansere kadar devam edebilmektedir. Bu süreç ile ilgili yoğun çalışmalara rağmen elde edilen bilgi, süreci net olarak açıklamaya yetmemektedir. Ancak her HPV enfeksiyonu kansere neden olmaz; HPV enfeksiyonu sonrası kanser olasılığı %1-3 arasındadır [7].

Enfeksiyonların önemli bir kısmı ilk yıl içerisinde bağışıklık sistemi tarafından eradike edilmektedir. HPV tipinin, eradikasyonda ve eradikasyonun süresinde önemli olduğu bilinmektedir. Nononkojenik HPV tiplerinde eradikasyon daha hızlı olmaktadır. HPV enfeksiyonunun maligniteye yönelmesini etkileyen, HPV tipi dışındaki diğer bir faktör enfeksiyonun persistansıdır. Persistansın karsinojenitede önemli olduğunu bununla beraber bu süreçte kesin gerekli olmadığı belirtilmektedir. Enfeksiyonların neden persiste olduğu kesin bilinmemekle birlikte; yüksek riskli onkojenik HPV tipinin, mevcut enfeksiyonun süresinin ve yaşın (yaş ile persistans olasılığı artmaktadır) persistans gelişimiyle ilgili olduğu düşünülmektedir [53-56].

Servikal karsinomların büyük bir çoğunluğu skuamöz hücreli kanserlerdir (%85) ve endoservikal kanalın kolumnar epitelinin ektoserviksin stratifiye skuamöz epitel ile yer değiştirdiği serviksin transformasyon zonunda gelişir. Adenokarsinom daha az görülür (%15) ve glandüler epitelden köken alır [49].

Servikal kanserin mikroinvaziv ve displastik safhasında hastalar tipik olarak asemptomatiktir ve Pap smear testiyle sitolojik inceleme sayesinde saptanabilir ve kolposkopik inceleme ve biyopsi ile doğrulanabilir. Eğer tedavi edilmezse, bu düşük dereceli lezyonlar servikal epitelin tamamının kalınlaşmasına kadar ilerler (CIS/karsinoma in situ) ve bazal membran tarafından oluşturulan duvarı geçerek invaziv olur. Bu süreç on yılları veya daha uzun bir süreyi gerektirebilir fakat sonuçta CIS'lı hastaların önemli bir bölümünde gerçekleşir. İnvaziv kanserdeki gibi, bu lezyon büyüyüp, küçük kan ve lenfatik damarlara ulaşarak çeşitli vücut bölgelerine metastaz yapabilir [49].

Bununla birlikte servikste kanser klinik olarak görülebilir hale geldiğinde vaginal akıntı ve/veya vaginal kanama mevcuttur ki bu şikayetler genellikle cinsel ilişki sonrasında ortaya çıkar. Bu belirtileri menstrüel kanama ve postmenapozal diğer kanama sebeplerinden ayırt etmek gerekir. Lokal olarak ilerlemiş hastalıkta alt ekstremitelerde ağrı ve/veya şişkinlik, yan ağrısı, rektal kanama, hematüri ve fistül gelişebilir. Metastazlar sonucu kemik fraktürleri, mide çıkışı obstrüksiyonu ve/veya hemoptizi gelişebilir. Servikal displazi için ortalama tanı yaşı 29 iken invaziv kanserde 47'dir [49].

### **2.8.8.Vulvar Kanserler**

Serviksin skuamöz hücreli karsinomlarında olduğu gibi vulvar karsinomlar da vulvar intraepitelyal neoplazi (VIN: Vulvar Intraepithelial Neoplasia) sonucu gelişir. Jinekolojik kanserlerin yaklaşık %4'ünü oluştururlar ve tipik olarak 70 ve 80 yaşları arasında görülürler. Risk faktörü bulunan (HPV enfeksiyonu, immünsupresyon) genç kadınlar da risk altındadırlar. Vulva kanserli olgularda HPV prevalansının %36 olduğu tahmin edilmektedir. Vulva kanserli olgular arasında en sık olarak HPV tip 16, ikinci sıklıkta ise HPV tip 18 görülmektedir. Yılda 26.000 civarında yeni olgu olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye'de İzmir'den ve Antalya'dan bildirilen verilere göre vulva kanseri insidansının 100.000'de 0.5 olduğu belirtilmiştir [21].

VIN'li hastalar genellikle asemptomatiktir ve lezyonlar rutin pelvik muayene sırasında saptanır. Bununla birlikte bazı hastalarda kaşıntı ve yanma olabilir. Yeni gelişen bir vulvar lezyon için biyopsi her zaman önerilmektedir. İnvaziv vulvar karsinomunun en sık görülen histolojik tipi skuamöz hücreli karsinomdur [49].

Skuamöz hücreli kanserlerin çoğunluğu unifokaldır ve primer olarak labia majörden köken alır. Labiaların lenfatik drenajı genellikle mons ve vulvar lenf nodlarına olur. Tümör aynı zamanda vagina, üretra ve rektum gibi komşu organları da invaze edebilir ve bu organların lenfatikleri ile de yayılım gösterebilir [49].

Yaşlı sigara içmeyenlere göre genç sigara içen vulvar kanserlilerde HPV DNA görülme olasılığı daha fazladır. HPV DNA'nın varlığı ve bölgesel nodal metastaz mevcudiyeti vulvar kanserden ölüm ve rekürrens üzerine etkilidir [57].

### **2.8.9.Vajina Kanseri**

Vajina kanseri tüm jinekolojik kanserlerin %2'sini oluşturur, sıklıkla gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Türkiye verilerinde vajina kanseri insidansının 100.000'de 0.1-0.2 olduğu belirtilmiştir. Serviks kanseri ve vajina kanseri aynı risk faktörlerini paylaşmaktadır, bu nedenle HPV vajina kanseri etyolojisinde de oldukça önemlidir. Vajina kanserli olguların %90'ında HPV DNA pozitif saptanmaktadır. HPV DNA pozitif saptanan olguların ise en azından %70'inden HPV tip 16 sorumludur [21].

### **2.8.10. Anal Kanser**

Anüsün skuamöz hücreli kanseri oldukça nadirdir ve genelde gastrointestinal sistem (GIS) kanserlerinin %1.5'ini oluşturur. Tüm dünyada yılda 99.000 yeni olgu görüldüğü belirtilmiştir. Yapılan araştırmalar insidansın arttığını göstermektedir. Anüs kanserli olguların %85'i HPV enfeksiyonu ile ilişkilidir. Bu hastalarda en çok izole edilen tipler ise serviks kanserinde olduğu gibi HPV 16 ve HPV 18'dir. Rektal kanama, anal kaşıntı, hemoroidde ağrı ile hastalar başvurur. Eğer kanama yanlılıkla hemoroidlere bağlanır ise tanı atlanmış olur. Erken evre kanserler asemptomatik olabilir. Ancak rektal tuşe ile saptanabilen lezyonlardır [21, 52].

Güncel çalışmalar HPV enfeksiyonunun, birden fazla HPV genotipi ile olan enfeksiyonun, servikal displazi veya kanserin, HIV pozitifliğinin, düşük CD4 düzeyinin, sigara içiminin, anal ilişkinin ve solid organ transplantasyonu sonrası immünyüpresyonunun risk faktörleri arasında olduğunu göstermektedir [58].

Öncül lezyon olan anal intraepitelyal lezyon genellikle anal siğillerin eksizyonları veya hemoreidektomi sırasında saptanmaktadır. Anal sitolojinin tanı için değeri tartışmalıdır [58].

### **2.8.11. Baş ve Boyun Kanserleri**

Baş ve boyun kanserlerinde genel olarak HPV enfeksiyonu söz konusu değildir ve şu ana kadar belirlenen kanıtlar sadece oral kanserlerin HPV pozitif olabileceğini göstermektedir. HPV pozitif olan oral tümörlerin %90'ı tip 16 ilişkilidir. Oral farinkste olan kanserlerin çoğu tonsil ve dil bölgesinde gelişmektedir. Her yıl için bu kanserlerin oranı 1973-1995 arasında ABD'de %2 artış göstermiştir. Bu artışın nedeni ise özellikle seksüel geçiş nedeni ile HPV enfeksiyonlarının artışı ile ilişkilidir. Bu tümörler için genital-oral seks risk faktörü olarak kabul edilmektedir [59].

## **2.9. Servikal Kanser Taraması**

Serviks kanserlerinde invazif kanser gelişene kadar iyi tanımlanmış uzun bir preinvazif sürecin varlığı ve bu organın kolayca gözlenebilmesi genel tarama programlarının geliştirilebilmesini sağlamıştır. Serviks kanseri büyük ölçüde önlenabilir bir hastalıktır. Özellikle tarama programları ile sıklıkla asemptomatik



olan prekürsör lezyonlar tanınabilir ve bunlar etkili bir şekilde tedavi edilebilmektedir [60].

Serviks kanserinde tarama serviks bölgesinden alınan yaymanın sitolojik incelenmesi esasına dayanır. Dr. Papanicolaou tarafından ortaya atılan bu yöntem kısaca Pap smear olarak bilinmektedir. Pap test, takip ve/veya tedavi gerektiren prekanseröz lezyonların tanınmasını amaçlayan, ikincil korunma yöntemidir. Eskiden daha çok invazif kanserleri belirleyebilirken günümüzde preinvazif sürecin ortaya çıkarılması için de bu yöntem kullanılmaktadır. Pap smear'in ucuz ve kolay uygulanabilirliği serviks kanserinden ölümlerin büyük bir bölümünü minimum düzeye getirmektedir [60, 61].

Pap test için alınan örnekler, serviksin vajinal kısmının, transformasyon bölgesinin ve endoserviksin, skuamöz epitelyum hücrelerini içermelidir. Hücrelerde HPV enfeksiyonuna bağlı sitopatik etkiler görülebilir. Servikal kanser, skuamöz intraepitelyal lezyon (squamous intraepithelial lesion; SIL) veya servikal intraepitelyal neoplazi (cervical intraepithelial neoplasia; CIN) olarak tanımlanan prekanseröz lezyonlardan gelişir [61].

Halen sitoloji raporlaması için kullanımda olan iki sistem vardır. Bunlar İngiliz Klinik Sitoloji Derneğinin sınıflaması ve Birleşik Devletlerden Bethesda 2001 Sistemi'dir [61].

**İngiliz Klinik Sitoloji Derneği sınıflamasında** anormal sitoloji; hafif, orta ve ciddi diskaryozis olarak sınıflandırılır ve histolojik tanıda sırasıyla CIN I (hafif displazi), CIN II (orta displazi) ve CIN III'e (ciddi displazi) eşdeğerdir. Hafif diskaryozis LGSIL'e (Low grade skuamöz intraepitelyal lezyon) karşılık gelirken orta ve ciddi diskaryozis HGSIL'e karşılık gelir. "Borderline" terimi ASCUS'a karşılık gelir [61].

**Bethesda sistem 2001** premalign skuamöz lezyonları üç kategoriye ayırmıştır;

- i. Atipik skuamöz intraepitelyal hücreler (ASC)
- ii. Low-grade skuamöz intraepitelyal lezyonlar (LGSIL)
- iii. High-grade skuamöz intraepitelyal lezyonlar (HGSIL)

ASC, önemi saptanamayanlar (ASCUS) ve high-grade lezyon dışlanamayanlar (ASC-H) şeklinde sınıflandırılır. ASCUS'da skuamöz hücreler tam

olarak normal görünmezler fakat hücre değişiminin anlamı belli değildir. ASC-H'de de hücreler anormal görünür ve anlamı belirsizdir; bununla birlikte prekanseröz lezyon olma riski ASC-US'dan yüksektir. LGSIL koilositik atipi veya hafif displazi olarak adlandırılan HPV ile uyumlu sitolojik değişimler içerir ve CIN I'e karşılık gelir. Diğer taraftan HGSIL servikal skuamöz hücrelerin boyut ve şekillerinde daha ciddi anormalliklerle karakterizedir ve bunların kansere ilerlemesi daha muhtemeldir. Bu CIN II ve CIN III'e karşılık gelen sitolojik bulguları ifade eder [61].

Pap testi sonucu anormal servikal sitolojik bulguları olan kadınlar kolposkobik inceleme sonucuna göre tedavi edilir. Gelişmiş ülkelerde yaklaşık 50 yıldır kullanılan Pap testi sayesinde servikal prekanseröz lezyonların erken tanısı ve tedavisi mümkün olmuş, servikal kanserin insidans ve mortalitesinde önemli düşüş görülmüştür. Servikal kanser insidansının %50-70 oranında azalmasına karşılık bu sonuç beklenenin çok altındadır. Şimdiye kadar herhangi bir popülasyondan servikal kanserin tam olarak eradike edilememesinin en önemli nedeni Pap smear testinin duyarlılığının oldukça düşük, %55-70 arasında olmasıdır [27].

Servikal sitoloji testi kanser taramasında çok etkilidir, fakat klinik olarak önemi olan lezyonlarda özgüllüğü sınırlıdır ve yüksek yanlış negatif sonuç verebilir. Kolposkopik biyopsi önceleri altın standart olmasına rağmen son çalışmalarda servikal biyopsinin tanı veya örnekleme hatalarından dolayı yüksek dereceli lezyonların %33-50'sinin gözden kaçırılabilceği belirtilmiştir. Bundan dolayı birbiriyle uyumsuz olduğu durumlarda; servikal sitoloji sonucunun mu yanlış pozitif olduğu yoksa biyopsi sonucunun mu yanlış negatif olduğunun ayrımını yapmak zor olabilir. Sitolojik olarak ASCUS tanısı konmuş hastaların servikal biyopsilerinde %5-17 CIN II-III bulunmaktadır. Sitolojik olarak ASC-H (atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion) tanısı konmuş olanların biyopsilerinde %24-94 CIN II-III lezyon bulunur. Sitolojik olarak LSIL tanısı konmuş olanların kolposkopik muayenesinde %25'inde CIN II-III, %45'inde CIN I bulunmuştur, fakat %25'in üstünde vakada displazi tespit edilmemiştir. Benzer olarak AGC (atypic glandular cells) tanısı almış hastalarda CIN II-III veya adenokarsinoma insitu bulunma olasılığı %9-41'dir. Servikal sitolojide yanlış negatif sonuçların oranı %1.6'dan %28'e kadar değişebilmektedir. Ayrıca invaziv servikal karsinomalı hastalar servikal yaymalarındaki az sayıda anormal hücrenin nekrotik debrüt,

inflamasyon veya kanama ile gizlenmesinden dolayı sitolojik olarak yanlış negatif tanı açısından yüksek bir riske sahiptirler. Bu sebeple yüksek dereceli lezyonlar ve karsinomanın tespit edilmesi için servikal sitolojinin sensitivitesini arttıran ve yanlış negatif sonuçları azaltan moleküler tanı yöntemlerinin de uygulanmasına ihtiyaç vardır [62-64].

HPV tipleri ile serviks kanseri ve kanser öncesi lezyonlar arasında kuvvetli bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu nedenle HPV DNA'yı tespit edip tipini belirlemenin klinik ve epidemiyolojik açıdan önemi açıkça görülmektedir. Serviksten alınan sürüntü örneklerinde ileri ve orta derecede onkojenik risk taşıyan HPV DNA'sının tespiti serviks kanserinin varlığının tahmininde veya kanser öncesi değişiklikleri göstermede önem taşımaktadır. Bu durum HPV testinin servikal kanser taramasında servikal kanser ve prekürsörlerinin tespiti için sitolojiye ilaveten yardımcı bir tarama testi olarak veya Pap testi yerine alternatif olarak tek başına bir tarama testi olarak değerlendirilmesine yol açmıştır [60].

Günümüzde servikal kanser taramasında, yüksek riskli HPV'nin saptanmasında HC 2 (QIAGEN, Hilden, Almanya), Cervista test (Hologic, Madison, WI, ABD) ve Roche Cobas 4800 HPV testi (Roche, Branchburg, NJ, ABD) olmak üzere üç yöntem FDA tarafından onaylanmıştır. Birçok HPV taraması kolposkopik biyopsi veya FDA onaylı ilk test olan HC 2 test ile yapılır [11].

Bazı çalışmalarda, lise çağındaki kadınlarda HPV DNA %70 oranında pozitif bulunmuştur. Testin pozitiflik oranı 30 yaşını aşkın kadınlarda kayda değer biçimde düşmekte olup buna sebep olarak kadınlardaki enfeksiyonun %90 oranında kendiliğinden sona ermesi gösterilmektedir. Dolayısı ile HPV DNA tarama testinin 30 yaş sonrası uygulanması geçici pozitif durumların ortadan kaldırılması için mantıklıdır, bu sayede ekonomik giderlerin kısıtlanması sağlanmış ve kadınların boşuna anksiyete yaşamalarının önüne geçilmiş olur. HPV testleri 30 yaşın üzerinde ortalama duyarlılığa sahiptir ve NPV değeri %97 üzerinde olup, %89-90 özgüllük söz konusudur [65, 66].

American Society for Colposcopy and Cervical Pathology consensus-temelli rehberler ASCUS'lu hastaların yönetiminde sitolojiye ek olarak HPV testinin kullanımını desteklemektedir, fakat diğer anormal servikal sitoloji sonucu olanlarda HPV testinin kullanımını desteklememektedir. Sitolojik tanısı LSIL olan kadınların yaklaşık %80'inin HPV DNA pozitif olduğu bilinmektedir. Çalışmalar LSIL'ı bulunan

kadınlarda tedavi sürecinde HPV testinin herhangi bir değeri olmadığını göstermektedir. Amerika Kolposkopi ve Servikal Patoloji Cemiyeti (ASCCP) bu tip durumlarda kadınların HPV testi yerine kolposkopiye yönlendirilmelerini tavsiye etmektedir [68].

Her ülkenin tarama programlarına bağlı olarak konvansiyonel sitolojik tarama güvenli bir şekilde 2-5 yıla uzatılabilir. Sitolojisi normal olan ve yüksek riskli HPV negatif olan iki testin NPV %100'e yakındır. HPV DNA test sonucunun negatif olması CINII/CINIII olasılığını %99 olasılıkla dışlamakta, prekanseröz lezyon mevcudiyetinin değerlendirilmesinde ve kolposkopi endikasyonunun belirlenmesinde hekime çok önemli bilgiler sağlamaktadır. Sonucun negatif bulunması gereksiz pek çok işlem yapılmasını ortadan kaldırmaktadır [62, 64].

FDA 2003 yılında 30 yaş ve üstündeki kadınlarda yapılan kanser taramalarında HPV DNA testinin Pap smear ile birlikte eş zamanlı kullanımını onaylamıştır. Ancak serviks kanseri araştırmalarında primer tarama testi olarak kullanılmasının daha doğru olduğu ve zaman içerisinde tek tarama testi olarak kullanılacağı yönünde makaleler yayınlanmaya başlamıştır. Servikal kanser tarama testlerinde anormal sitoloji tespit edilen hastaların mutlaka HPV DNA testi ile birlikte değerlendirilmesi hastalığın kesin tanısı, prognozu ve tedavisi hakkında yol göstermektedir. Bu yaklaşımla hastalara gereksiz invazif girişimler önlenmekte ve ülke ekonomisine önemli bir katkı sağlanmış olmaktadır. Gelecekte servikal kanser önleme programlarında, yalnızca HPV DNA PCR testinin kullanılacağı ve servikal sitoloji tekniklerinin ise yükek riskli HPV pozitif bulunan kadınlarda kanserleşme sürecini takip etmek için kullanılacağı ileri sürülmektedir [62, 69, 70].

## **2.10.Tanı Yöntemleri**

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. Siğil ve benzeri lezyonların tanısı genellikle klinik olarak konulmaktadır. Bazı genital ve servikal lezyonlar da klinik muayene sırasında tanınabilmektedir. Klinik değerlendirme için; lezyonların kolposkopi ile incelenmesi, %3-5'lik asetik asit uygulaması ile beyaz alanların görülmesi, sitolojik muayene, histopatolojik inceleme yapılabilir. Bununla

birlikte HPV enfeksiyonlarının çoğu klinik belirti vermez, latent veya subklinik enfeksiyonlar yaygındır. Bu sebeple HPV enfeksiyonlarının tanısında virolojik tanı yöntemlerinin kullanımı daha yaygındır [5, 27, 71].

HPV standart hücre kültürü sistemlerinde üretilmemektedir; serolojik testlerin ise tanıda kullanımları çok kısıtlıdır, yeterince duyarlı değildir. İmmün cevapta majör kapsid proteinlerine karşı gelişen antikorlar uzun yıllar tespit edilir düzeyde kaldığından serolojik testler akut ve geçirilmiş enfeksiyonları ayırt etmek için uygun değildir. HPV ile enfekte hücrelerde immünohistokimyasal yöntemlerle HPV kapsid antijenlerinin tespiti ise sadece prodüktif HPV enfeksiyonu varsa mümkündür, ancak yeterince duyarlı değildir. Sitolojik inceleme ile eksfoliyeye hücre ve doku örneklerinde HPV enfeksiyonunun karakteristik sitopatik etkisi “koilositozis” tespit edilirse de duyarlılığı düşüktür. Bu nedenle özellikle servikal örneklerde HPV varlığının gösterilmesi ve etken tiplerin belirlenebilmesi amacıyla moleküler yöntemler kullanılmaktadır [5, 27].

HPV enfeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler yaklaşımlar üç başlık altında incelenebilir;

1) Direk prob yöntemleri: Bunlar, in-situ hibridizasyon (ISH), southern blot hibridizasyon (SBH), dot-blot hibridizasyon (DBH) ve floresans in situ hibridizasyon (FISH).

2) Sinyal amplifikasyon yöntemleri: HC yöntemi gibi sinyal amplifikasyon ile direk DNA tespiti.

3) Hedef amplifikasyon yöntemleri: Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction; PCR) gibi DNA amplifikasyon testleri.

HPV'nin tanı yöntemleri arasında PCR en duyarlı yöntemdir ve referans test olarak kabul edilir. PCR ve Hybrid Capture (HC) testleri tanıda en çok kullanılan testlerdir [5, 72, 73].

### **2.10.1.Direk Hibridizasyon**

Hibridizasyon testleri HPV ile ilgili ilk çalışmalarda kullanılmıştır. In situ hibridizasyon (ISH) hem parafine gömülü doku örnekleri hem de servikal yaymalarda HPV antijenlerinin veya nükleik asitin (DNA veya mRNA) özgül proplar ile birleşmesi temeline dayanmaktadır. Biotinlenmiş proplar, rutin olarak kromojenik

substratlar ile saptanabilir ve yöntem klinik kullanımlar için otomatize edilmiştir (Ventana Benchmark Staining System, Ventana Medical Systems, Tucson, Ariz). Bu testle virusun hücredeki lokalizasyonu; hücrede entegre veya epizomal halde bulunup bulunmadığı tespit edilebilir. Sinyal amplifikasyonu (catalyzed reporter deposition or CARD), floresan problemlerin kullanımı, küçük nanoprobaların kullanımı (Nanoprobes, Yaphank, NY) ve bu tekniklerin kombinasyonu ile duyarlılıkta gelişmeler sağlanmıştır. Bununla birlikte örnek toplama, saklama veya işlem sırasında hedef nükleik asit kaybı teknik için önemli bir sınırlayıcı etkidir. Çoğu ticari olarak kullanılan DNA problemlerinde HPV tiplendirilmesi için gruplandırılmış problemler bulunmaktadır. Örneğin Enzo Life Sciences, Inc.(Farmingdale, NY) ve DakoCytomation (Copenhagen, Denmark) in situ tiplendirme ve görüntüleme tarama testleri HPV 16 ve 18'i tanıyabilir, ancak birbirinden ayırt edemez. Bazı testler (Bio Genex, San Ramon, Calif ), hem oligonükleotid prob kokteyllerini hem de tip spesifik problemleri içerir. Ventana yüksek riskli HPV'ler için 13 genotip içeren kromojenik tarama testidir [69, 72].

In situ hibridizasyonun avantajı, spesifik hücrelerde (normal hücreler veya koilositlere karşı tümör hücreleri) HPV infeksiyonunu tanımlayabilmesi ve aynı zamanda fiziksel durumunun belirlenebilmesi (episomal HPV veya hücre genomu içerisine integrasyon) olmasıdır. Eğer tanı yönteminin duyarlılığı fazla ise, aynı zamanda entegre olmuş HPV kopyalarının sayısı da belirlenebilir. Fiyat en önemli dezavantajdır, multiple in situ hibridizasyon deneyleri her HPV tipi ve her örnek için yapılmalıdır [74].

Southern blot hibridizasyon (SBH) testi PCR ile kıyaslandığında özgülüğü ve duyarlılığı daha düşüktür. Alternatif olarak HPV DNA, dot blot hibridizasyon ve floresans in situ hibridizasyon (FISH) ile tespit edilebilir. Bu testler genellikle araştırma amacıyla kullanılır, yapılması yorucu ve zaman alıcıdır. Fazla sayıda örneğin incelenmesi için uygun değildir, rutin olarak kullanılmaz [72].

### **2.10.2.Sinyal Amplifikasyon Testi**

Sinyal amplifikasyon testi olan Hybrid Capture testinin Hybrid Capture 1 (HC 1) ve Hybrid Capture 2 (HC 2) olmak üzere iki tipi mevcuttur. Hybrid Capture Tube test (HCT) olarak da bilinen HC 1 testi tüpte yapılan non-radyoaktif sinyal

amplifikasyon yöntemidir. Bu test ile 5 düşük riskli HPV ve 9 yüksek riskli HPV tipi tanınmaktadır. Cut off değeri 10 pg HPV DNA/ml'dir. HC 2 test, HC 1 testinin mikropalak formatında geliştirilmiş versiyonudur. Yüksek riskli HPV tip sayısı 13'e yükseltilmiştir. Cut off değeri 1 pg HPV DNA/ml'dir. HC 2 HPV testi HC 1'e göre 10 kat daha yüksek duyarlılığa sahip olmakla birlikte özgüllüğü de artmıştır [72, 75].

HPV tanısı için FDA onayı almış ilk test HC 2 testidir (Digene, Gaithersburg, Md). FDA ilk kez Mart 1999'da ASC-US tanısı alan kadınların yönlendirilmesi için sitolojik teste yardımcı test olarak ve daha sonra 2003 yılında 30 yaş ve üstü kadınlarda servikal sitoloji taramasına yardımcı test olarak HC 2 testinin kullanımını kabul etmiştir. Bu günümüzde en çok kullanılan, klinik onay almış yöntemdir. HC 2 testi örnekteki hedef HPV DNA'nın özgül RNA probları ile solüsyon fazda hibridizasyonuna dayanır. HC 2 test sisteminde servikal kanserde en yaygın bulunan 13 yüksek risk (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve 5 düşük risk (6, 11, 42, 43, 44) HPV tipinin genomik sırasına komplementer RNA probları kullanılır ki bu özgül RNA probları yüksek risk tip prob kokteyl ve düşük risk prob kokteyl formatında hazırlanmıştır. İki farklı RNA prob kokteyli deneyde ayrı ayrı kullanılır ve böylece test, örnekteki HPV DNA'nın sadece düşük veya yüksek risk grubunda olduğu hakkında bilgi verir, ancak spesifik HPV genotipi hakkında bilgi vermez [27].

HC 2 testinde, servikal sürüntü şeklinde alınan hücreler transport besiyerine konur. Sonra DNA denature edilerek tek sarmallı hale getirilir ve hasta örneğindeki tek sarmallı hedef HPV DNA, yüksek ve düşük risk RNA prob kokteyl ile ayrı ayrı inkübe edilerek DNA-RNA hibridizasyonu gerçekleşir. Oluşan bu hibridler DNA-RNA'ya karşı özgül antikorlarla kaplı mikropalaga transfer edilir. Mikropalak kuyularına bağlı antikorlar tarafından yakalanan hibridler daha sonra ilave edilen alkalin fosfataz ile konjuge anti-hibrid antikorlarına bağlanır. Fazla antikorlar ve hibridize olmamış proplar yıkama ile uzaklaştırılır ve kalan hibridler, alkalin fosfataz enzimi ile reaksiyona giren kemiluminesen substrat ilavesi ile oluşan ışık sonucu tespit edilir. Yayılan ışık miktarı luminometrede ölçülür ve her örnek tarafından oluşturulan ışık miktarı, testteki üç kalibratörün yaydığı ışık miktarının ortalamasına bölünmesi ile elde edilen oran olan relative light unit (RLU) olarak ifade edilir ve örnekteki mevcut hedef DNA miktarı ile orantılıdır. HC 2 testi viral yükün semikantitatif ölçümünü sağlar.

Pozitif sonuçlar için FDA'nın kabul ettiği cut off değeri 1.0 RLU'dur ve 1 pg/ml HPV DNA'dır ve bu değer, yaklaşık 5000 genoma denk gelir. Cut off değerinden yüksek bulunan örnekler pozitif kabul edilir. HGSIL tespitinde histolojik tanı referans test olarak dikkate alındığında HC 2 testinin duyarlılığı, %84 ile %100 arasında, özgüllüğü %85-89 arasında değişmektedir [27].

Bununla birlikte bu yöntem örnekte hücresel DNA miktarının kontrolünü yapamamaktadır. HC 2 yöntemi sadece yüksek riskli ve düşük riskli HPV tiplerinin tanınması için dizayn edilmiştir ve özgül tipleri belirleyemez; ancak yüksek riskli veya düşük riskli tiplerden en az birinin var olduğunu gösterebilir. Bu durum yöntem için önemli bir sınırlayıcıdır. Kolay uygulanabilirliği ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilir olması bu yöntemin önemli avantajıdır. HC 2 testi birçok ülkede klinik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Klinik değerlendirmede sadece yüksek risk prob kokteyli kullanılması test süresini ve maliyeti azaltır [71, 79].

Yeni prototip Hybrid Capture 3 testi geliştirilmiştir. Bu versiyonu, HC 2 testine benzer ve aynı RNA problemleri kullanılır. DNA-RNA hibridlerini yakalamak için HC 2 testindeki anti DNA-RNA antikolları yerine, kuyucukları streptavidin ile kaplı mikrotitrasyon plağı kullanıldığından HC 2'ye göre daha duyarlıdır [27].

### 2.10.3.Nükleik Asit Amplifikasyon Testi

PCR en yaygın kullanılan hedef amplifikasyon yöntemidir. Servikal HPV analizi için araştırmalarda çok yaygın kullanılmasına rağmen laboratuvarlar arası standardizasyonu yoktur. PCR testinin özgüllüğü ve duyarlılığı PCR ürünlerinin uzunluğu, reaksiyonda kullanılan DNA polimeraz performansı, kullanılan primer seti ve reaksiyon şartları gibi faktörlere dayanarak değişir [27].

PCR yönteminin, tip spesifik ve konsensus testler olmak üzere 2 ana tipi vardır. Tip spesifik test tek bir HPV genotipinin amplifikasyonu için dizayn edilmiştir. Her bir hasta örneği için çok sayıda PCR yapılmasını gerektirdiğinden maliyeti artar ve tanı süresi uzar. Halbuki konsensus PCR testleri ile HPV tiplerinin büyük bir kısmının saptanarak gösterilmesi mümkündür. Çeşitli konsensus primer sistemleri mevcuttur. Bu primerlerle çok sayıda farklı HPV genotipleri amplifiye edilebilir. HPV genomunun son derece iyi korunan bölgesi olan L1 genini hedef alan konsensus veya genel primerler en çok tercih edilir ve bu primerlerle hemen hemen bütün mukozal



HPV tipleri tespit edilebilir. E1 bölgesinden köken alan çok sayıda geniş spektrumlu PCR primerleri bildirilmiş olmakla birlikte henüz çok yaygın kullanılmamaktadır [72, 76, 77].

HPV genomunun L1 bölgesine yönelik en yaygın kullanılan konsensus primer setleri; MY09/11 ve modifiye versiyonu PGMY09/MY11, GP5/GP6 ve daha uzun versiyonu GP5+/GP6+ ve SFP primerleridir. MY09/MY11 primerleri L1'e ait 450 bç, GP5/GP6 primerleri 150 bç ve SFP primerleri 65 bç'lik bölgeyi hedef alır [73].

PGMY09/11 primerleri orijinal MY09/11 primerleri gibi L1 geninin aynı 450 bç'lik bölgesini amplifiye eder. Ancak PGMY09/11 sistemi iki primer yerine non-degenerate olan birçok primerin belirli karışımlarda kullanıldığı iki primer havuzundan oluşur. Bu havuzlardan birincisi olan upstream primer havuzunda 5 primer (PGMY11) ve downstream primer havuzunda 13 primer (PGMY09) bulunur. PGMY09/11 primer sisteminin duyarlılığı her PCR amplifikasyonu için 10 HPV genomudur [27].

GP5/GP6 primerleri L1 geninin 150 bç'lik bölgesini hedef alan non-degenerate primerlerdir. Bu primerlerle yapılan amplifikasyon reaksiyonunda düşük bağlanma ısısı kullanılır. Sonrasında geliştirilen GP5+/GP6+ primerlerinin GP5/GP6 primerlerinden en az 10 kat daha duyarlı olduğu gösterilmiştir [27].

Diğer bir konsensus primer seti olan SPF (short PCR fragment) primerleri MY09/11 ve GP5+/GP6+ primerleri ile kıyaslandığında L1 bölgesinde sadece 65 bç'lik daha küçük bir bölgeyi amplifiye eder, böylece testin duyarlılığı artar. Genelde PCR amplifikasyonlarının duyarlılığı, çoğaltılan bölgenin büyüklüğü ile ters orantılıdır [27].

**HPV PCR amplifikasyon ürünlerinin analizi:** Konsensus HPV primerleri ile yapılan PCR testi sonucu HPV pozitif bulunan örneklerde daha sonra spesifik HPV tipinin tespiti için hibridizasyon, dizi analizi, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve tip spesifik PCR (TS-PCR) gibi testlerden biri kullanılır. Ancak servikal mukozayı enfekte eden 40'dan fazla HPV tipi bulunduğundan her örnek için çok sayıda SBH testi veya tip spesifik PCR testinin ayrı ayrı yapılması gerekir ki bu da zaman alıcı ve yorucu olup rutin uygulamaya uygun değildir. Bu nedenle PCR sonrası HPV tiplerinin tanısı için mikropakta hibridizasyon (PCR-ELISA) ve Line Probe Assay (LİPA) gibi alternatif genotipleme sistemleri geliştirilerek en az 40 kadar HPV tipinin ayrımının yapılması sağlanmıştır [73].

Reverse line blot hibridizasyon assay olarak da bilinen LiPA, naylon strip veya nitroselüloz membran üzerine immobilize olmuş özgül DNA problemleri ile amplikonun hibridizasyonu esasına dayanır. Hibridizasyonu tespit için PCR ürünü biotin ile işaretli primerlerle muamele edilir. Daha sonra alkalen fosfatazla işaretli streptavidin konjugat ile tespit edilir; streptavidin amplikon üzerindeki biotine bağlanır. Alkalen fosfataz, substrat ilavesi ile renk oluşumunu katalize eder ve amplikonun özgül proba hibridize olduğu yerde renkli çizgi oluşur [27].

Mikroplak hibridizasyon (PCR-ELISA) yöntemi de, biotin ile işaretli primerler kullanılarak yapılır. Böylece biotinli PCR ürünleri mikroplağın streptavidin kaplı kuyularında yakalanır. Ardından amplikon, ilave edilen digoksigenin işaretli özgül HPV problemleri ile hibridize edilerek, substrat ilavesiyle oluşan renk değişimi tespit edilerek test sonuçları değerlendirilir [73].

RFLP'de ise çeşitli endonükleazlar kullanılarak, HPV-DNA özgül bazı çiftlerinden kesilir ve agaroz jel elektroforezi ile tespit edilebilen her biri farklı boyutlarda bantlar oluşturulur. Kullanım için seçilen endonükleazın uygunluğu her bir HPV genomunun önceden hazırlanan restriksiyon haritası sayesinde ve seçilen endonükleazın amplifiye edilen DNA segmentinde meydana getireceği kesim sayısı da belirlenir. RFLP pahalı değildir ancak uğraştırıcı bir yöntemdir ve manuel bir teknik olmasından dolayı her deneyde farklı sonuçlar alınabilir [78].

HPV-DNA dizi analizi pahalı ve hızlı bir yöntemdir. Dezavantajı, multiple HPV tiplerinde duyarlılığının düşük olmasıdır. Klinikte HPV genotiplendirmesi için rutin olarak uygulanan bir yöntem değildir.

Pyrosequencing (Biotage, Uppsala, İsveç) geleneksel dizi analizi yöntemlerine alternatif bir yöntemdir, genotiplendirme ve özellikle kısa dizi analizlerinde yararlı olduğu görülmüştür. Pyrosequencing DNA sentezi sırasında oluşan pirofosfatın luminometrik tespiti temeline dayanmaktadır [29].

Bir dizi analiz primeri tek iplikli PCR amplikonu ile hibridize olur ve DNA polimeraz, ATP sülfürilaz, lusiferaz, apiraz, substratlar olan adenozin 5' fosfosülfat ve lusiferin ile inkübe edilir. Dört dNTP'den ilki reaksiyon karışımına ilave edilir. DNA polimeraz DNA ipliklerine dNTP'nin eklenmesini katalize eder. Her bir birleşme olayına birleşen nükleotid miktarı ile eşit oranda pirofosfat (PP<sub>1</sub>) salınımı eşlik eder. ATP sülfürilaz niceliksel olarak adenozin 5' fosfosülfat varlığında pirofosfat ATP'ye çevirir.

Bu ATP, lusiferaz aracılığı ile lusiferini oksilusiferine çevirir ve ATP miktarı ile orantılı olarak ışık oluşmasına sebep olur. Reaksiyonda oluşan ışık şarja bağlı bir kamera ile tespit edilir. Nükleotid eklenme sayısı ile orantılı olarak oluşan her bir pikin yüksekliğini ölçen bir program geliştirilmiştir. Nükleotid yıkan enzim olan apiraz, düzenli bir şekilde ATP'yi ve eklenmiş dNTP'yi yıkar. Bu yıkım oluşan ışıkları azaltır ve reaksiyon solüsyonunu yeniler. Bir sonraki dNTP ilave edilir ve süreç devam eder. Geleneksel dizi analiz yöntemlerinden farklı olarak pyrosequencing dizi analiz primer sonuna bitişik diziler için güvenli veri sağlamaktadır. Ayrıca pyrosequencing yönteminin kullanımı kolaydır ve kısa okuma uzunluğu olan diziler için güçlü bir şekilde kullanılmaktadır [29].

HPV testlerinin performansı araştırıldığında genelde HC 2 testi ile yapılan çalışmalardan elde edilen özgüllük ve duyarlılık ile ilgili iyi uyum görülmektedir. Bu sonuç ticari kitlerle standardizasyonun gerekliliğini ortaya koymaktadır. MY09/MY11 PCR ve GP5+/GP6+ PCR sonuçları arasında da iyi korelasyon vardır. Buna karşılık örnek alma yönteminde farklılıklar, örnek transportu ve saklama, DNA ekstraksiyon prosedürleri ve özellikle PCR reaksiyonunda farklı polimerazların kullanımı testin performansını etkiler. Bu nedenle geçerli protokol/reagen ve referans örnekler geliştirilmelidir. Yakın zamanda DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) hem epidemiyolojik çalışmalar hem de aşı etkinliği çalışmalarına temel sağlamak amacıyla kullanımda olan testin analitik özgüllük ve duyarlılığının değerlendirilmesi için HPV DNA referans örnek panelini hazırlamıştır [27].

Multiple HPV tipleri ile enfeksiyon, viral persistans ve yüksek grade prekanseröz lezyonlara ilerleme, servikal kanser gelişmesi için önemli bir gösterge olabilir. Servikal kanser açısından risk altında olanların erken tanısı amacıyla; HPV viral yük ölçümü, multiple enfeksiyonların tespiti ve yardımcı test olarak telomeraz enzim aktivitesinin tespiti gibi testler geliştirilmesi ile ilgili araştırmalar devam etmektedir [79, 80].

Prekanseröz lezyonların gelişmesi ve servikal kansere progresyon riskini değerlendirmek için yüksek risk HPV 16 ve 18 tiplerinin E6/E7 onkogen transkriptlerin reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) ile tespiti özellikle yüksek riskli HPV ile enfekte displazisi olmayan hastalar ve hafif displazisi olan (CIN I) hastalarda faydalı olabilir. E6/E7 transkriptlerin tespitinin lezyonun ciddiyeti ile korele olduğu

birçok çalışmada gösterilmiştir. Şimdilik ticari olarak mevcut tek RNA bazlı HPV testi Pre Tect HPV-Proofer (Norchip AS, Norway) olup RNA E6/E7 transkriptlerinin NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) ile amplifikasyonu esasına dayanır [73].

HPV tip 16'nın kanser hücrelerinde morfolojik analizinin yapılması da servikal kansere progresyonun anlaşılmasında yardımcı olabilir. Konak kromozomuna entegre HPV DNA servikal neoplazi ile ilişkilidir. HPV'nin hücre genomuna entegrasyonu ile E2 ORF'u bozulur [27].

Yüksek HPV viral yükünün servikal lezyonların gelişmesi ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Düşük analitik duyarlılığı olan HC 2 ile sadece yeteri kadar yüksek viral yükü tespit edebilir ki bunlar klinik önemi olan enfeksiyonları ayırt etmede rolü olabilir. Viral yük miktarı direk olarak örnekteki total hücre miktarına bağlıdır. Bu sebeple hücre yükünün ayarlanması gerekir. Real-time PCR (TaqMan) ile hücre içeriğinin ölçümü de yapılabildiğinden viral yük daha doğru tespit edilir [27].

#### 2.10.4.Tanıda Yeni Gelişmeler

HPV tanısı ve genotip tespiti için hızlı, özgül, duyarlı ve düşük maliyetli yeni teknolojik yöntemler klinikte aktif olarak kullanılmaktadır. Luminex xMAP süspansiyon yöntemi tip spesifik oligonükleotid problemleri kullanarak 100 farklı HPV genotipini tespit edebilmektedir. Bu oligonükleotid problemleri polystyrene mikroparçacıklarına bağlanır ve Luminex 100 cihazında okunur. Daha sonra biotin işaretli PCR ürünleri mikroparçacık ile bağlanmış problemlere hibridize edilir. Her bir mikroparçacık Luminex tarafından yüksek akımlı sıvı akışkan içerisinde iki ayrı lazer ile okunur ve yüzeydeki hibridizasyon miktarı belirlenir [78].

Invader HPV testi FDA tarafından Mart 2009'da onaylanmış bir test olup, bu teknik iki izotermal reaksiyondan oluşur. İlk reaksiyon hedef DNA sırası üzerinde gerçekleşir ve ikinci reaksiyon floresan sinyal oluşturur. İlk reaksiyonda hedef DNA sırasına biri prob nükleotid diğeri invader oligonükleotid olan iki tip spesifik oligonükleotid hedef DNA sırasına bağlanır. Bu oligonükleotidler hedef sıra ile en az bir baz çakışacak şekilde dizayn edilmiştir ve Cleavase enziminin substrat olarak kullanılacağı bir invaziv yapı oluşur. Enzimin etkisiyle probun 5' ucundan "flap" denen parça ayrışır. Ayrışan flap sonra universal floresan rezonans enerji transferi (FRET)

yapan proba bağlanarak yine Cleavase enziminin substrat olarak tanıyacağı ikinci bir invaziv yapı oluşturur ve enzimin etkisiyle quencher molekülünden floroför ayrışarak floresan sinyal oluşur. Bu yöntemin bir avantajı da örneklerde yeterli DNA varlığını gösteren internal kontrol bulunmasıdır [81].

Viral yük yüksek dereceli servikal lezyonlar ile pozitif korelasyon gösterir ve hastalık takibinde önemlidir. Viral yükün yüksek olması persistan enfeksiyon ve hastalığın ilerlediğini, düşük viral yük ise viral temizlenmeyi gösterir. Real time PCR tip spesifik HPV DNA'yı hedefleyen ve servikal örneklerde viral yükün belirlenmesinde kullanılan en iyi yöntemdir. HC 2 yöntemi de viral yükün semikantitatif olarak tahmin edilmesini sağlar, ancak düşük kopya sayılarının tespitinde başarısız olabilir [82].

E6 ve E7 onkogenlerinin ekspresyonu ile p53 ve Rb sürekli salınır, bu durum hücrenin malign transformasyonu ile sonuçlanır. PreTect HPVProofer assay (NorChip AS, Klokkestua Norway) real-time multipleks nükleik asit dizi amplifikasyonu ile E6/E7 mRNA'larını tespit eder. Pozitif sonuçlar E6/E7 integrasyonunu ve hastanın persistan enfeksiyon için yüksek risk altında olduğunu gösterir [83].

Gen-Probe (San Diego, Calif) APTİMA HPV testini geliştirmiştir ve bu test HPV enfeksiyonunun tanısı için yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. APTİMA yöntemi manyetik kaplı parçacıklara hedef rRNA'yı bağlayarak, örneklerdeki rRNA'nın parsiyel saflaştırılmasını sağlar. Saflaştırılan rRNA'nın amplifikasyonu için izotermal transkripsiyon aracılı amplifikasyon ile RNA-DNA hibridleri oluşturan DNA problrı kullanarak RNA amplifiye ürünlerini tespit eder. Bu yöntem E6/E7 onkogenlerini hedef alır. Bundan dolayı persistan enfeksiyon için yüksek riskteki kadınların tespit edilmesinde faydalıdır [82].

## 2.11.Tedavi

HPV enfeksiyonlarının kadınlardaki tedavisinde DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) genel olarak lezyonları iki başlık altında toplamaktadır:

- a) Servikte premalign olduğu düşünülen lezyonlar
- b) Serviks dışı genital siğiller

Serviksin premalign lezyonlarında amaç mümkün olduğunca konservatif davranarak tüm transformasyon zonunun ortadan kaldırılması ve hastanın düzenli

aralıklarla ömür boyu kontrol edilmesidir. Başlıca tedavi yöntemleri, kriyoterapi, lazer, elektrokoter veya cerrahidir. DSÖ tarafından önerilen kadınlardaki serviks dışı genital HPV enfeksiyonlarının tedavilerindeki amaç enfeksiyonun başka bir yere geçişini önlemek ve kişiyi psikolojik olarak rahatlatmaktır. Buradaki lezyonlar daha çok onkojenik potansiyeli düşük HPV tipleri tarafından oluşturulmaktadır [60].

Erkeklerde HPV tarafından oluşan lezyonların tedavisi kadınlardaki eksternal genital lezyonların tedavisi gibidir. Erkek ve kadınlarda tekrarlayan vakalarda lokal 5-fluorourasil veya sistemik ve/veya lezyon içine interferon tedavisi uygulanabilir. Genelde pahalı oluşu, yan etkileri nedeniyle interferon önerilmemektedir [60].

HPV'ye bağlı lezyonlarda tedavi endikasyonu ve yaklaşımı, lezyonun yeri, özellikleri gibi faktörler göz önüne alınarak kararlaştırılmaktadır. Doğrudan virusa yönelik tedavinin etkinliği net değildir ve özellikle intraepitelyal neoplazilerde geçerliliği yoktur [84].

## **2.12.Korunma**

Bilindiği gibi HPV cinsel yolla bulaşan bir hastalıktır. Cinsel ilişki yaşının mümkün olduğu kadar geciktirilmesi ve menarş yaşından uzaklaştırılması, sigara içilmemesi, partner sayısının az olması en mantıklı, doğal öneriler olarak kalmaktadır. Cinsel hayatı aktif olan insanların genel önlemleri alması HPV enfeksiyonundan korunmak için tek yoldur. Fakat HPV, bulaşıcılığı çok yüksek olan bir virustur ki bazı durumlarda prezaratif kullanımı bile yetersiz olabilmektedir. Bu nedenle serviks dışı genital siğilleri olan kadınlarla, ayrıca gözle görülebilen genital siğil lezyonları bulunan kişilerle (erkek veya kadın) ilişkiye girmemek korunmada son derece önem taşımaktadır. Bütün bu korunma önlemleri dışında kadınların rutin jinekolojik muayenelerini aksatmamaları gerekmektedir [60, 85].

Günümüzde uygulanan etkin korunma, DNA testleri, smear, kolposkopi ve benzerleri ile HPV'yi erken belirleyip, sebep olduğu lezyonları erken tedavi ederek, invaziv kanser gelişmesini önleme şeklinde uygulanan sekonder korunmadır. Bunun yerine proflaktik aşı uygulaması ile primer korunma daha mantıklıdır [85].

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Eskişehir Bölgesi'nde yaşayan kadınlarda Human Papilloma Virus (HPV) prevalansının ve tip dağılımının, iki farklı moleküler yöntemle ve Pap smear testi ile saptanmasını ve bu üç yöntemin birbirleri ile karşılaştırılmasını amaçlayan bir araştırma projesi planlandı. Araştırma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklendi ve bu komisyonun 22.04.2011 tarih ve 6 sayılı toplantısında onaylandı. Araştırmaya başlamak için ESOĞÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 31.05.2011 tarih ve 08 sayılı kararı ile onay alındı. Etik kurul ve ilgili bölümler tarafından belirtilen öneriler doğrultusunda araştırma düzenlendi.

Araştırma sırasında, örnek toplanması ve patoloji sonuçlarının değerlendirilmesi basamaklarının Eskişehir İl Sağlık Müdürlüğüne bağlı olarak Yunus Emre Devlet Hastanesi bünyesinde faaliyet gösteren Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi'nde (KETEM) uygulanabilmesi için Eskişehir İl Sağlık Müdürlüğü ve Eskişehir Valiliği'nden gerekli izinler alındı.

Araştırma grubunu oluşturmak için Eskişehir KETEM'e tarama amaçlı başvuran, 30-65 yaş arası kadınlara hem sözlü olarak hem de aydınlatılmış onam formları ile bilgilendirme yapıldı. Onayları alınan 1081 kadın araştırmaya dahil edildi. Araştırma grubundaki kadınlara, demografik bilgilerin ve olası risk faktörlerinin sorgulandığı anket uygulaması yapıldı ve kadınlardan; biri sitolojik inceleme ve diğer ikisi iki ayrı moleküler yöntemde kullanılmak üzere eş zamanlı olarak üç ayrı servikal sürüntü örneği önerilere uygun şekilde alındı.

Alınan servikal sürüntü örnekleri ivedilikle ve düzenli şekilde ESOĞÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirilerek çalışmaya başlanıncaya kadar, uygun süre ve sıcaklıkta saklandı.

#### 3.1.Örnek Toplama

1. Pamuklu eküvyonlar (dacron çubuk veya cotton swab) kullanılarak servikal os ve ektoserviks çevresindeki fazla mukus uzaklaştırıldı. İşlem sırasında kullanılan pamuklu eküvyonlar talimatlara uygun olarak atıldı.

2. Servikal örnekleme fırçası, servikal kanal içerisine tamamen sokulmadan; fırçanın en geniş dış kılları ektoservikse dar kısmı endoservikse dokunacak şekilde,

1-1.5 cm kadar servikal os içerisine yerleştirilerek, saat yönünün tersine üç tam tur çevrilerek sürüntü örneği alındı.

3. Fırça kılları, vajen duvarına, tüpün dışına veya başka herhangi bir yere dokundurulmadan kanaldan çıkarılarak servikal örnekleme tüpü içerisine yerleştirildi.

4. Fırça gövdesi çentik çizgisinden kırıldı.

5. Servikal örnekleme tüpünün kapağı tık sesi duyulacak şekilde yerine sıkıca oturtularak yerleştirildi.

6. Mikrobiyolojik testler için alınan servikal örnekler, çalışılma zamanına göre, 2-8 °C de 1 hafta veya -20 °C’de 3 aya kadar saklandı.

### **3.2. Sinyal Amplifikasyon Yöntemi (HC 2) ile HPV DNA Varlığının Saptanması**

Çalışmada servikal örneklerde HPV varlığının tespiti için, 13 yüksek risk (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve 5 düşük risk (6, 11, 42, 43, 44) HPV tipini saptayabilen Hybrid Capture 2 (HC 2; Qiagen, Hilden, Almanya) kiti kullanıldı.

#### **Hazırlık Aşaması:**

1. Pleyt okuma cihazı ve bağlı olduğu bilgisayar açıldı. Çalışmaya başlamadan önce, çalışılacak pleyt’in hangi kuyucuğunda, hangi numaralı örneğin çalışılacağı bilgisayara kaydedilerek pleyt şablonu yazıcıdan çıktı olarak alındı ve çalışma boyunca el altında tutuldu.

2. İçerisine MST Rack’ın boyutuna uygun şekilde distile su konmuş olan sıcak su banyosu ve ısı bloğu açılarak sıcaklıkları 65°C’ye ayarlandı.

3. Kit içerisinden çıkan yıkama solüsyonu (wash buffer) 30 katı oranında distile su ile karıştırılarak yıkama solüsyonu hazırlandı (66.6 ml wash buffer konuldu, üzerine 2 lt’ye tamamlayacak miktarda distile su konuldu).

4. Çalışmaya başlarken öncelikle, kit kutusu içerisinde bulunan denaturation reagent şişesinin içerisine, yine aynı kit kutusu içerisinden çıkan mor renkteki indicator dye sıvısından 5 damla damlatılarak, kullanıma hazır hale getirildi.

#### **Denatürasyon Aşaması:**

1. Çalışmaya alınacak olan tüm örnekler, negatif kalibratör, düşük risk



kalibratör, yüksek risk kalibratör, düşük risk kalite kontrol ve yüksek risk kalite kontrol tüpleri çıktısı alınan pleyt şablonuna göre MST Rack'ına yerleştirildi ve kapakları itina ile açıldı.

2. Negatif kontrol'e 1 ml, diğer tüm tüplere (örnekler ve kalibratörler dahil) 500'er µl olacak şekilde hazırlanan mor denatürasyon solüsyonundan konuldu.

3. Tüm tüplere denatürasyon solüsyonu dağıtıldıktan sonra, kapağı çıkarılmış olan bu tüplerin üzerleri naylon film ile kapatıldı ve MST çalkalayıcıda, en son devirde, 1 dakika vortekslendi.

4. Ardından MST Rack, ısısı  $65^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanan sıcak su banyosu içerisine konularak,  $45\pm 5$  dakika inkübasyona bırakıldı.

### **Hibridizasyon Aşaması:**

1. Su banyosundan MST Rack ile çıkartılan örnekler, bir kez daha 10 saniye MST çalkalayıcıda en son devirde vortekslendi.

2. Daha sonra örnekler, ayrıca temin edilmiş olan mikropleyt kuyucukları içerisine, çıktısı alınan pleyt şablonu üzerinde yazan pozisyon sırasına göre 75'er µl dağıtıldı ve oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Mikropleytin bir yarısında yüksek risklilerin tespiti için çalışma yapılırken diğer yarısında aynı örneklerden düşük risklilerin saptanması için çalışıldı.

3. Bu süre içerisinde, ayrı bir tarafta yüksek risk ve düşük risk için ayrı ayrı kombine prob karışımı hazırlandı. Bu aşamada kullanılacak oranlar, Tablo 3.1'de belirtilmiştir:

Tablo 3.1. Kombine prob karışımı

1:25 Dilüsyon	Probe	Probe Diluent
96	160 µl	4 ml
72	120 µl	3 ml
48	80 µl	2 ml
24	40 µl	1 ml
1	1.8 µl	0.045 ml

4. Hazırlanan kombine prob karışımından multi kanallı pipetör küvetine boşaltıldı.

5. Multi kanallı pipetör yardımıyla 25'er µl, uygun mikropleyt kuyucuklarına (Yüksek Risk'ler için High Risk Combined-Probe Cocktail; Düşük Risk'ler için Low Risk Combined-Probe Cocktail) dağıtıldı.

6. Mikropleytin kapağı kapatıldıktan sonra, rotary çalkalayıcıda 1100 rpm'de 2-3 dakika çalkalandı. Bu sırada, mor renkteki kuyucukların, sarı renge döndüğü gözlemlendi.

7. Çalkalama sonunda eğer halen mor renkli kuyucuklar var ise, üzerlerine 25 µl, uygun risk kombine prob karışımından eklenerek, çalkalama işlemi tekrarlandı.

8. Tüm kuyucuklar sarı renge döndükten sonra, mikropleyt ısıtıcıda 65°C'de 60±5 dakika inkübasyona bırakıldı.

#### **Hibritlerin Yakalanması Aşaması:**

1. Mikropleyt'deki tüm örnek miktarı, multi kanallı pipet yardımı ile kit içerisinden çıkan hibridizasyon pleytindeki ilgili kuyucuklara aktarıldı.

2. Pleytin kapağı kapatıldıktan sonra, çalkalayıcıda 1100 rpm'de, oda ısısında 60±5 dakika inkübasyona bırakıldı.

#### **Hibritlerin Tespiti Aşaması:**

1. İnkübasyon sonrasında, pleyt kuyucukları içerisindeki tüm sıvılar, bir lavabo kenarında ters çevrilmek suretiyle, hızlı bir şekilde çırpılarak boşaltıldı. Bu işlem sırasında kontaminasyonu engellemek amacıyla, pleytin düz çevrilmemesine dikkat edildi.

2. Ardından, birkaç kat serilen kağıt havlu üzerine, pleyt kuyucuklarındaki tüm sıvı tükenene kadar çırpılarak, kurutulmaları sağlandı. Bu aşamada da yine kontaminasyonu engellemek amacıyla, her bir çırpma işlemi ayrı bir kat kağıt havlu üzerinde yapıldı.

3. Kurutma işleminin ardından, tüm kuyucuklar için detection reagent-1 Tablo3.2'de belirtilen oranlara uygun olarak hazırlanıp multi kanal pipetör küvetine boşaltıldı:

Tablo 3.2. Detection reagent-1 için belirtilen oranlar

Kuyucuk sayısı	Detection Reagent-1 miktarı
96	Şişenin tamamı
72	7 ml
48	5 ml
24	3 ml
1	0.125 ml

4. Hazırlanan detection reagent-1'den 75'er µl, multi kanallı pipetör yardımı ile tüm kuyucuklara dağıtıldı ve oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

5. İnkübasyon sonrasında, pleyt yıkayıcı yardımıyla, hibridizasyon pleyti yıkandı.

6. Bu aşamanın ardından, tüm kuyucuklar için detection reagent-2, Tablo3.3'deki oranlarda uygun olarak hazırlanıp multi kanal pipetör küvetine boşaltıldı:

Tablo 3.3. Detection reagent-2 için belirtilen oranlar

Kuyucuk sayısı	Detection Reagent-2 Miktarı
96	Şişenin tamamı
72	7 ml
48	5 ml
24	3 ml
1	0.125 ml

7. Hazırlanan detection reagent-2'den 75'er µl, multi kanallı pipetör yardımı ile tüm kuyucuklara dağıtıldı ve oda ısısında, karanlıkta (cihaz içerisinde) 15 dakika inkübasyona bırakıldı; çünkü inkübasyonun karanlık ortamda gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

#### **Analiz Aşaması:**

İnkübasyonun ardından hibridizasyon pleyti, DML 2000 (Digene) cihazına konularak, bilgisayarda analiz edildi.

### 3.3. HPV Konsensus Real-Time Polimerize Zincir Reaksiyonu ve Dizi Analizi

Bu aşamaya rastgele seçilen 152 kadının servikal örnekleri dahil edildi.

Analitik protokol aşamaları;

1. DNA ekstraksiyonu
2. Amplifikasyon ve melting
3. Melt analiz ile kalitatif HPV saptanması
4. Örnek hazırlanması ve sekanslama reaksiyonu
5. Sonuçların analizi ve genotipin belirlenmesi
6. Sekans sonrası işlemler

#### **DNA Ekstraksiyon Aşaması:**

DNA izolasyonu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **Ön hazırlıklar:**

1. Isı bloğu 56°C'ye ayarlandı.
2. Örnek sayısı kadar 1.5 ml'lik ependorf tüp ikişerli gruplar halinde numaralandırıldı.
3. Çalışma adedi kadar spin kolon çıkarıldı.
4. Yıkama solüsyonu 1'e (AW-1) 25 ml etanol, yıkama solüsyonu 2'ye (AW-2) 30 ml etanol eklenerek hazır hale getirildi. Kapakları üzerindeki kutucuklar işaretlendi.
5. Örnekler vortekslendi.

#### **Çalışma:**

1. Servikal sürüntü örneklerinden 200'er µl alınarak, 1.5 ml'lik ilk ependorflara dağıtıldı.
2. Örneklerin üzerlerine 200'er µl Buffer AL (Lysis Buffer) ve 20'şer µl proteinaz K eklendi.
3. Ependorf tüplerinin kapakları kapatılıp her biri 3-5 saniye vortekslenip spin santrifüj yapıldı.
4. Santrifüjlenen örnekler, önceden 56°C'ye ayarlanmış olan ısı bloğunda 15 dakika inaktivasyona bırakıldı.

5. Isı bloğundan alınan örneklerin üzerlerine 200 µl etanol ilave edilerek, tekrar vortekslendi ve spin santrifüj yapıldı.

6. Daha sonra, ependorflardaki karışımların tamamı spin kolonlara aktarıldı.

7. Tüm spin kolonlar, kapaklı santrifüj cihazında 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

8. Bu sırada yeni boş koleksiyon tüpleri spora dizildi.

9. Spin kolonların alt kısımları atılıp, üstteki filtreler boş koleksiyon tüplere alındı.

#### **Yıkama:**

1. Daha önceden hazırlanmış olan yıkama solüsyonu 1'den (AW-1) 500 µl, filtre kısımlarına eklenip, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

2. Bu sırada spora yeni boş koleksiyon tüpler dizildi.

3. Santrifüjden çıkan tüplerin alt kısımları atılıp, üstteki filtreler boş spin kolonlara alındı.

4. Filtre kısımlarının üzerlerine 500'er µl yıkama solüsyonu 2 (AW-2) eklendi.

5. Tüm spin kolonlar, 13.000-14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.

6. Bu sırada yeni boş koleksiyon tüpleri sporlara dizildi.

7. Santrifüj yapılmış olan spin kolonların alt kısımları atılıp, üstteki filtreler boş spin kolonlara alındı.

8. Tüm spin kolonlar, 13.000 rpm'de 1 dakika boş olarak santrifüj edildi.

9. Bu sırada yeni boş ependorflar sporlara dizildi.

10. Santrifüjden çıkarılan tüplerin alt kısımları atılıp, yeni ependorflara filtre kısımları yerleştirildi.

11. Tüplerin filtre kısımlarına 60 µl elution buffer (Buffer AE) ilave edildi.

12. Tüm ependorflar, kapakları içe gelecek şekilde santrifüje dizilerek, 8000 rpm'de 1 dakika çevrildi.

13. Santrifüjden sonra bu kez üst (filtre) kısımları atılıp, alttaki sıvı (DNA) içeren ependorfların ağızları kapatılarak PCR çalışması için hazır hale getirildi.

\*Ekstraksiyon ürünü olan DNA çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı.

### Amplifikasyon Aşaması:

Çalışmaya başlamadan en az 20 dakika öncesinde PCR cihazı açıldı. Bu sırada -20°C’de saklanmakta olan; ekstraksiyonu yapılmış örnekler, TaKaRa Ex Taq R-PCR Custom kiti (HPV DNA’nın GP5+/GP6+ bölgesini hedefleyen primer çifti ihtiva etmektedir), EvaGreen Dye ve  $\beta$ -globulin primeri (HPV sign PQ kutusu içerisindeki) dışarı çıkarılarak hazırlık aşaması tamamlandı.

### Çalışma:

1. Oda sıcaklığına çıkarılmış olan kit içerisindeki solüsyonlar (dNTP mixture, Mg solüsyonu, 5X Real Time PCR buffer), EvaGreen Dye ve  $\beta$ -globulin primeri vortekslenip spin santrifüjlendi.

2. Kit içerisindeki solüsyonlardan, EvaGreen Dye ve  $\beta$ -globulin primerinden, Tablo3.4’te belirtilen oranlarda, 2 ml’lik ependorf tüpü içerisinde konularak PCR karışımı hazırlandı.

Tablo 3.4. Amplifikasyon karışımı için belirtilen oranlar

Amplifikasyon karışımı	Her bir reaksiyon için reagent volümü ( $\mu$ l)	N sayıda örnekle çalışma için reagent volümü (+1)
Takara R-5X PCR buffer (Mg <sup>+2</sup> içermeyen)	20	20x(n+1)
Takara dNTP karışımı (her dNTP için 10 nM)	2	2x(n+1)
Takara 50 mM Mg <sup>+2</sup> solüsyonu	3	3x(n+1)
Takara Ex Taq <sup>TM</sup> HS (5 U/ $\mu$ l)	1	1x(n+1)
EvaGreen Dye <sup>TM</sup> (20X in water)	5	5x(n+1)
HPV/ $\beta$ -globin primerleri	3	3x(n+1)
Su	56	56x(n+1)
Toplam volüm	90	90x(n+1)

3. Hazırlanan karışım kullanılmadan önce kısaca vortekslenip spin santrifüj yapıldı.

4. Örneklerin ve PCR karışımının konulacağı 0.2ml’lik tüpler ile pozitif ve negatif kontrol tüpleri soğuk bloğa dizildi.

5. Her çalışmaya en az bir negatif amplifikasyon kontrolü (su) ve pozitif amplifikasyon kontrolleri (HPV ½ pozitif kontrol, HPV 3 pozitif kontrol ve HPV 4 pozitif kontrol) konuldu.

6. Hazırlanan PCR karışımı santrifüjlenerek soğuk bloğa dizilmiş olan tüplerin her birine 90 µl olacak şekilde dağıtıldı.

7. Sonrasında, çalışılacak olan klinik örnekler kısa bir süre vortekslenerek spin santrifüj yapıldı ve PCR karışımı konulmuş olan 0.2 ml'lik tüplere 10'ar µl olacak şekilde dağıtıldı. Aynı şekilde pozitif ve negatif kontrol tüplerine de 10'ar µl kontroller konuldu. Bu aşamalarda EvaGreen Dye'in ışıktan etkilenmemesi için mümkün olduğunca hızlı davranıldı.

8. PCR için uygun hale getirilen örnekler PCR rack'ına dizilerek Rotor Gene Q (Qiagen) cihazına yerleştirildi ve kapağı kapatılarak çalışma başlatıldı.

9. PCR siklusu: aşağıda belirtildiği şekilde uygulandı.

95 °C'de 3 dakika	} 50 siklus
95 °C'de 30 saniye	
44 °C'de 30 saniye	
72 °C'de 30 saniye	

#### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçlarının Değerlendirilmesi:**

Cihazın çalışması bittikten sonra Rotor-Gene Q'nun bağlı olduğu bilgisayarda Rotor-Gene Software Version 1.7 (built 87) programında Melt Curve analizi ile sonuçlar değerlendirildi. Oluşan HPV ve β-globin piklerine göre HPV pozitiflik ve negatiflikleri program tarafından saptanarak HPV taraması tamamlandı.

#### **3.4. Pyrosequencing ile Genotip Tayini**

Konsensus Real-Time PCR ile yapılan HPV taraması sonucunda HPV DNA varlığı saptanan örneklerde HPV sign kiti (Diatech pharmacogenetics, Jesi(AN), İtalya) kullanılarak pyrosequencing yöntemi ile genotip tayini yapıldı.

##### **Ön Hazırlık:**

1. PyroMark Q24 (Qiagen) sekans cihazı çalışmaya başlamadan 90 dakika önce açıldı.

2. Kartuş (cihaza konulacak olan pipetleme ünitesi) ultra saf su ile sağılarak tıkanıklık olup olmaması açısından kontrol edildi.
3. İşlem için gerekli olan reagentler ve materyaller oda ısısına çıkarıldı.
4. PCR'dan çalışma dosyası hazırlandı.
5. Isı blokları açılıp biri 90°C'ye, diğeri 60 °C'ye ayarlandı ve üzerlerine PyroMark Q24 pleyt taşıyıcılar yerleştirildi.
6. Çalkalayıcı (T-shaker) açılarak 1400 rpm'e ayarlandı.
7. Vakum çalışma istasyonunda uygun bölgelere küvetler yerleştirildi.
8. Vakum çalışma istasyonu aşamasında kullanılmak üzere ultra saf su ve saf etanol kullanılarak 50 ml %70'lik etil alkol solüsyonu hazırlandı.
9. Liyofilize enzim ve substrat 620 µl ultra saf su ile süspansiyon haline getirilerek vorteks kullanılmadan nazikçe karıştırıldı ve tamamıyla süspansiyon haline geldiğinden emin olmak için en az 10 dakika beklendi.

#### **Amplifikasyon Ürünlerinin Sepharose Bilyelere Bağlanması:**

1. Streptavidin Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, İsveç) bilyelerini içeren şişe nazik bir şekilde çalkalanarak homojen bir solüsyon elde edildi.
2. Tablo 3.5'te belirtilen oranlara göre 2 ml'lik bir ependorf içerisine bağlanma karışımı hazırlandı. Karışımın miktarı toplam reaksiyon sayısı için (toplam kullanılacak kuyucuk sayısı) gereken miktardan yaklaşık %10 daha fazla olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 3.5. Bağlanma karışımı için belirtilen oranlar

<b>Bağlanma karışımı (Binding-Mix)</b>	<b>1 reaksiyon için reagent volümü (10 µl amplifikasyon ürünü)</b>	<b>1 reaksiyon için reagent volümü (20 µl amplifikasyon ürünü)</b>	<b>6 örnek (24 kuyucuk) için</b>
Streptavidin Sepharose bilyeler	2 µl	2 µl	2 x 26 = 52 µl
SEQ binding buffer PQ	40 µl	40 µl	40 x 26 = 1040 µl
Ultra saf su	28 µl	18 µl	28 x 26 = 728 µl
<b>Toplam volüm</b>	<b>70 µl</b>	<b>60 µl</b>	



3. Hazırlanan bağlanma karışımı, örnek hazırlama pleyti (sample preparation plate PQ) içerisine her bir kuyucuğa; PCR analizindeki melt peak dF/dT oranı >3 ise 60 µl, melt peak dF/dT oranı 1.6 ve 3 arasında ise 70 µl olacak şekilde dağıtıldı.

4. Her bir kuyucuğa, ilgili örnek amplifikasyon ürününden 20 µl (melt peak dF/dT oranı >3 ise) veya 10 µl (melt peak dF/dT oranı 1.6 ve 3 arasında ise) eklendi.

5. Üzerine sızdırmaz şeffaf bant kapatıldı.

6. Pleyt 1400 rpm hızına ayarlı çalkalayıcıda ve oda sıcaklığında en az 15 dakika çalkalandı.

### **Sekanslama İçin Örnek Hazırlanması:**

1. Bu sırada sekans primerleri kısaca vortekslenip spin yapıldı.

2. Tablo 3.6'da gösterildiği oranlarda; ilgili dört sekans primerinden, her biri için farklı 2 ml'lik ependorf tüplere, kuyucuk başına 1µl; birleşme solüsyonundan (annealing buffer) ise kuyucuk başına 24 µl, toplamda kuyucuk başına 25 µl olacak şekilde konularak birleşme karışımı (annealing karışımı) hazırlandı.

Tablo 3.6. Birleşme karışımı için belirtilen oran

<b>Birleşme-karışımı</b>	<b>1 reaksiyon için reagent volümü (µl)</b>
SEQ annealing buffer PQ	24
HPV 1 seq primer PQ	1
HPV 2 seq primer PQ	
HPV 3 seq primer PQ	
HPV 4 seq primer PQ	
Toplam volüm	25

3. Birleşme karışımı tekrar vortekslenip kısa spin yapıldı ve PyroMark Q24 pleyttteki ilgili kuyucuklara 25'er µl pipetlendi.

4. Vakum çalışma istasyonundaki küvetlerin içerisine; %70'lik etanol, denatürasyon solüsyonu, yıkama solüsyonu ve ultra saf su, her sıvı kendi ilgili küvetine gelecek şekilde küvet üzerinde işaretli olan kısma kadar konuldu.

5. Daha sonra seri bir şekilde çalkalayıcıdaki örnek hazırlama pleyti ve PyroMark Q24 pleyti, aynı oryantasyonda olmasına dikkat edilerek, vakum çalışma alanında ilgili yerlere yerleştirildi.

6. Vakum pompası ve el ünitesinin üstündeki vakum anahtarı açıldı.

7. Seferoz bilyeler çok çabuk çöktüğünden filtre problemleri hızlı ve dikkatli bir şekilde örnek hazırlama pleytinin üstüne getirilerek kuyuların içine daldırıldı ve tüm karışım (bağlanma karışımı/beadmiks+amplifikasyon ürünü) vakumla çektilerle sepharose bilyeler yakalandı.

8. Daha sonra el ünitesi sırasıyla;

%70 etanol içeren küvete daldırılarak 5 saniye,

Denatürasyon solüsyonu içeren küvete daldırılarak 5 saniye,

Yıkama solüsyonu içeren küvete daldırılarak 10 saniye bekletildi.

9. El ünitesi 90°'yi geçen bir açıyla 5 saniye tutularak filtre problemlerinden sıvının uzaklaştırılması sağlandı.

10. Vakum hem el ünitesinden hem de motordan kapatılıp, içinde biraz önce sekans primerleri dağıtılmış PyroMark Q24 pleyti içerisine daldırıldı.

11. PyroMark Q24 pleyt kuyucuklarına daldırılmış olan el ünitesinin problemleri nazikçe sallanarak seferoz bilyeleri, sekans primerini içeren birleşme karışımına bıraktırıldı.

12. İşlem tamamlanınca (hafif bulanık sıvılar gözleendiğinde) el ünitesi ultra saf su içeren küvete daldırarak 10 saniye nazikçe çalkalandı.

13. El ünitesi ultra saf su içeren diğer küvete daldırılarak vakum pompası ve ünitenin vakum anahtarı açılarak, kaptaki 70 ml su çektilerildi.

14. El ünitesi dikey biçimde 90°'den biraz geniş bir açıyla 5 saniye tutularak filtre problemlerinden sıvının uzaklaştırılması sağlandı.

15. El ünitesinin vakum anahtarı ve vakum pompasının düğmesi kapatıldı ve "parking" yazan bekleme yerine yerleştirildi.

16. Örnek hazırlama pleyti folyo ile kapatılarak hızla imha edildi.

17. PyroMark Q24 pleyt, önceden 90°C'ye getirilmiş pleyt taşıyıcı üzerine konarak 90°C±2°C'de 2 dakika inkübe edildi.

18. Daha sonra, PyroMark Q24 pleyt hızlıca, 60°C'ye ayarlanmış diğer pleyt taşıyıcı üzerine konarak 60°C±2°C'de 10 dakika inkübe edildi.

19. Bu sırada kartuş (PyroMark Q24 cartridge) içerisine, A-C-G-T nükleotidlerinin her birinden 94 µl, enzim ve substrat reagenlerinin her birinden 119 µl ilgili kuyucuklara konuldu.

20. PyroMark Q24 pleyt pleyt taşıyıcı üzerinden kaldırılarak oda sıcaklığında 5 dakika soğumaya bırakıldı.

21. Süresi dolan PyroMark Q24 pleyt ve hazırlanan kartuş PyroMark Q24 cihazına yerleştirilerek çalışma başlatıldı.

### **Pyromark Q24 Cihazının Çalıştırılması ve Sonuçların Analizi:**

1. Kartuş cihazdaki yuvasına, etiket kendimize bakacak şekilde dikkatlice sonuna kadar itilerek ve daha sonrasında aşağı doğru itilerek yerleştirildi ve emniyet tutacağı kapatıldı.

2. Pleyt tutacağı açıldı, PyroMark Q24 pleyt bloğa yerleştirilip pleyt tutacağı tekrar kapatıldı.

3. Çalışma dosyasını içeren USB cihazın üstündeki USB girişine sokuldu.

4. Menüden ok tuşları yardımıyla “Run” komutu seçildi ve “OK”e basıldı.

5. Ok tuşları yardımıyla çalışma dosyası seçildi ve “Select”e basıldı.

6. Run işlemi yaklaşık 45 dakika sürdü. Run işlemi bittikten ve cihaz run dosyasının USB’ye kaydedildiğini doğruladıktan sonra “Close”a basıldı.

7. USB çıkarıldı.

8. Cihazın kapağı açıldı. Kartuşun emniyet tutacağı açıldı ve kartuş dikkatli bir şekilde ilk önce yukarı, daha sonra öne doğru çekilerek yerinden çıkarıldı.

9. Pleyt tutacağı açılarak PyroMark Q24 pleyt, bloktan çıkarılarak atıldı ve kartuş temizliği yapıldı.

10. Sonuçların analizine geçildi.

11. PyroMark Q24’teki çalışma dosyasını içeren USB bilgisayara takıldı.

12. Bilgisayardaki program yardımıyla sonuçların analizi yapıldı.

13. Analiz raporu verileri HPV sign PQ kitapçığındaki yorum ve tablolara göre değerlendirilerek sonuçlandırıldı.

### 3.5. İstatistiksel Analiz

Tüm veri analizleri SPSS 20.0 paket programları ile yapılmıştır. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak, Nitel veriler ise n, ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdellik değerler olarak ifade edilmiştir. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım göstermeyen verilere Mann-Whitney U testi, kategorik yapıdaki veri setlerine ise Chi-square testleri uygulanmıştır.  $P < 0.05$  olasılık değerleri önemli olarak kabul edilmiştir.

#### 4.BULGULAR

Araştırmamızda, Eskişehir Bölgesi'nde servikal kanser tarama programına dahil olan kadınlarda; Pap smear testi ile sitolojik değişikliklerin saptanması ve iki farklı moleküler yöntemle HPV DNA prevalansı ve tip dağılımlarının belirlenmesi, bu üç yöntemin sonuçlarının birbirleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Araştırmaya Eskişehir Yunus Emre Devlet Hastanesi bünyesinde faaliyet gösteren Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi'ne (KETEM) tarama amaçlı başvuran, 30-65 yaş arası 1081 kadın dahil edilmiştir. Araştırmaya katılan tüm kadınların servikal örnekleri Pap smear ve Hybrid Capture 2 (HC 2) yöntemleri ile test edilmiş, daha sonra rastgele seçilen 152 kadının servikal örneği konsensus Real-Time PCR ile taranarak HPV DNA varlığı saptanan örneklerde pyrosequencing ile genotiplendirme yapılmıştır. Öncelikle 1081 kadının Pap smear sonucu ve HC 2 sonucu istatistiksel olarak irdelenmiş sonrasında da üç yöntemin çalışıldığı 152 kadının servikal örneklerinin sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Patoloji raporunda herhangi bir epitel hücre anormalliği (ASCUS, AGUS, LGSIL, HGSIL) olan kadınların Pap smear testi sonucu pozitif olarak yorumlanmıştır.

Araştırma grubunu oluşturan 1081 kadının yaş aralıkları 30-65 yıl arasında olup yaş ortalaması  $48.57 \pm 8.48$  yıldır. Kadınların evlilik yaşları 12-43 yıl arasında değişmekle birlikte ortalama evlilik yaşı  $20.26 \pm 3.79$  yıl olarak hesaplanmıştır. Araştırmaya katılan kadınların evlilik süreleri ise 1-50 yıl arasında olup ortalama evlilik süresi  $27.22 \pm 10.18$  yıldır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Araştırma grubunda bazı değişkenlerin ortalama değerleri

Değişken	Min (yıl)	Maks (yıl)	Ortalama (yıl)	Std. sapma
Yaş	30	65	48.57	8.48
Evlilik yaşı	12	43	20.26	3.79
Evlilik süresi	1	50	27.22	10.18

Araştırma grubundaki kadınlar medeni durumları yönünden sorgulandığında 953 (%88.2)'ü evli, 128 (%11.8)'i ise dul olduğunu belirtmişlerdir. Evlilik yaşları açısından gruplara ayrılarak değerlendirildiklerinde bunların büyük kısmını, 529

(%48.9) kadın ile evlilik yaşı 20 yılın altında olanlar (12-19 yıl) oluşturmaktadır. Evlilik sayıları 1-4 arasında değişmekle birlikte 1030 (%95.3)'ü bir kez, 51 (%4.7)'i birden fazla kez evlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Araştırma grubunda değişkenlerin dağılımı

<b>Değişken</b>	<b>Sıklık (n)</b>	<b>Oran (%)</b>
<b>Medeni durum</b>		
Evli	953	88.2
Dul	128	11.8
<b>Evlilik yaşı</b>		
12-19 yıl	529	48.9
20-24 yıl	430	39.8
25 yıl üzeri	122	11.3
<b>Evlilik sayısı</b>		
Tek	1030	95.3
Birden fazla	51	4.7
<b>Partner sayısı</b>		
Tek	1030	95.3
Birden fazla	51	4.7
<b>Sigara</b>		
Kullanıyor	829	76.7
Kullanmıyor	252	23.3
<b>Eğitim</b>		
12 yıl ve altı	985	91.1
12 yıl üzeri	96	8.9
<b>Yaşadığı yer</b>		
Kırsal	31	2.9
İl	1050	97.1
<b>Kullanmakta olduğu korunma yöntemi</b>		
Menopoz	516	47.7
Üretken çağ	565	52.3
Yok	102	9.4 (18.1)
Var	463	42,9 (81.9)

Araştırma grubundaki kadınların 1030 (%95.3)'ü cinsel partner sayısını tek, 51 (%4.7)'i ise birden fazla olarak belirtmiştir. Kadınların 829 (%76.7)'ü sigara kullanmıyorken, 252 (%23.3) kadın sigara kullanmaktadır. Eğitim süresi yönünden iki gruba ayrıldığında eğitim süresi 12 yıl ve altında olan kadınların sayısı 985 (%91.1), eğitim süresi 12 yıl üzeri olan kadınların sayısı ise 96 (%8.9) olarak bulunmuştur. Araştırmaya dahil edilen kadınların 31 (%2.9)'i kırsalda, 1050

(%97.1)'si ilde yaşamaktadır. Kadınların 516 (%47.7)'sı menopozda iken 565 (%52.3) kadın üretken çağdadır. Üretken çağdaki kadınlardan 102 (%18.0)'sinin herhangi bir doğum kontrol yöntemi uygulamadıkları saptanırken 131 (%23.2) kadının uyguladığı koitus interruptus en fazla uygulanan doğum kontrol yöntemi olarak belirlenmiştir. Etkili bir doğum kontrol yöntemi kullanımına bakıldığında, 124 (%21.9) kadının kullandığı yöntem olan kondom üretken çağdaki kadınlar arasında en çok kullanılan etkili doğum kontrol yöntemi olarak görülmektedir (Tablo 4.2).

Gebelik sayıları 0-14 arasında değişmekte olup kadınların çoğunda gebelik sayısı 2 (276 kadın %25.5) olarak saptanmıştır. Doğum sayısı ise 0-11 arasında olup kadınların çoğunda doğum sayısı 2 (544 kadın %50.3) olarak belirlenmiştir.

#### 4.1. Pap Smear ve Sinyal Amplifikasyon (HC 2) Yöntemlerinin Bulguları

Araştırmaya katılan kadınların 74 (%6.8)'ü Pap smear ve/veya Hybrid Capture 2 (HC 2) testlerinden en az biri ile pozitif saptanmıştır. Her iki testle de pozitif saptanan kadın sayısı 5 (%0.5) iken her iki testle de negatif saptanan kadın sayısı 1003 (%92.8) tür. Kadınların 32 (%3.0)'sinde HC 2 testi pozitif iken 47 (%4.4)'sinde Pap smear sonucu pozitif saptanmış, 5 (%0.5) kadının Pap smear testi sonucu değerlendirme için yetersiz olarak raporlanmıştır. Bu 5 kadından 4'ünün HC 2 testi negatif saptanırken, 1 kadının HC 2 testi sonucu ise düşük risk HPV pozitif olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. HC 2 ve Pap smear sonuçları karşılaştırması

HC 2 Pap smear	HC 2 negatif	HC 2 pozitif	Toplam
Pap test negatif	1003	26	1029
Pap test pozitif	42	5	47
Yetersiz materyal	4	1	5
<b>Toplam</b>	1049	32	1081

Tablo 4.3'te görüldüğü gibi Pap smear testi sonucu pozitif olup HC 2 testi negatif olanların sayısı 42 (%3.9) iken HC 2 testi pozitif olup Pap smear testi sonucu negatif olanların sayısı 26 (%2.4) olarak bulunmuştur.

Pap smear testi pozitif raporlanmış olan 47 kadının sonuçlarının Bethesda sistemine göre dağılımı Tablo 4.4'te görülmektedir. Buna göre; 40 (%85.1) ASCUS, 3 (%6.4) AGUS, 3 (%6.4) HGSIL ve 1 (%2.1) LGSIL olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.4. Pap smear sonuçları dağılımı

<b>Pap test sonucu</b>	<b>Sıklık(n)</b>	<b>Oran (%)</b>
<b>ASCUS</b>	40	85.1
<b>AGUS</b>	3	6.4
<b>LGSIL</b>	1	2.1
<b>HGSIL</b>	3	6.4
<b>Toplam</b>	47	100

Araştırmaya katılan 1081 kadının 32 (%3.0)'sinde HC 2 yöntemi ile HPV varlığı saptanmıştır. Örneklerin 22 (%68.8)'si yüksek risk HPV, 9 (%28.1)'u düşük risk HPV, 1 (%3.1)'i hem yüksek risk hem düşük risk HPV tipiyle pozitif olarak belirlenmiştir (Tablo 4.5). Bu sayıların tüm kadınlar içerisindeki oransal dağılımları ise; yüksek risk HPV ile pozitiflik %2.0, düşük risk HPV ile pozitiflik %0.8, hem yüksek risk hem düşük risk HPV tipiyle pozitiflik %0.1 şeklindedir.

Tablo 4.5. HC 2 testi pozitif 32 servikal sürüntü örneğinin grup içi dağılımı

<b>HC 2 sonucu</b>	<b>Sıklık (n)</b>	<b>Oran (%)</b>
<b>Yüksek risk</b>	22	68.8
<b>Düşük risk</b>	9	28.1
<b>Yüksek/Düşük risk</b>	1	3.1
<b>Toplam</b>	32	100



Pap smear testi sonuçları HC 2 testi sonuçları ile karşılaştırıldığında; ASCUS olanların 3 (%7.5)'ünde yüksek riskli HPV, 1 (%2.5)'inde düşük riskli HPV; HGSIL olanların 1 (%33.3)'inde yüksek riskli HPV; yetersiz yayma nedeniyle değerlendirilemeyenlerin 1 (%20.0)'inde düşük riskli HPV varlığı gösterilmiştir. Pap smear testi sonucu ASCUS olarak raporlanan 40 örneğin 36 (%90.0)'sında, AGUS olarak raporlanan 3 (%100) örneğin hiçbirinde, HGSIL olarak raporlanan 3 örneğin 2 (%66.7)'sinde, LGSIL olarak raporlanan 1 (%100) örnekte ve yetersiz yayma olarak raporlanan 5 örneğin 4 (%80.0)'ünde HC 2 testi ile HPV varlığı saptanmamıştır. Pap smear testi ile negatif saptanan 18 örnek HC 2'de yüksek riskli HPV ile pozitif olarak belirlenmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Pap smear testi ve HC 2 test sonuçlarının 1081 kadında karşılaştırılması

<b>HC 2</b> <b>Pap test</b>	<b>HC 2</b> <b>negatif (n)</b>	<b>HC 2</b> <b>yüksek risk</b> <b>(n)</b>	<b>HC 2</b> <b>düşük risk</b> <b>(n)</b>	<b>HC 2</b> <b>yüksek/düşük</b> <b>risk (n)</b>	<b>Toplam</b> <b>(n)</b>
<b>Negatif (n)</b>	1003	18	7	1	1029
<b>ASCUS (n)</b>	36	3	1	0	40
<b>AGUS (n)</b>	3	0	0	0	3
<b>LGSIL (n)</b>	1	0	0	0	1
<b>HGSIL (n)</b>	2	1	0	0	3
<b>Yetersiz</b> <b>yayma (n)</b>	4	0	1	0	5
<b>Toplam (n)</b>	1049	22	9	1	1081

Tablo 4.7. HC 2 testi ile pozitif saptanan kadınların anket sonuçları

	HC 2 pozitif *n (%), **Ortanca (%25 %75)	HC 2 negatif *n (%), **Ortanca (%25 %75)	p
<b>* Yaş</b>			p>0.05
30-39 yıl	6 (%3.4)	169 (%96.6)	
40-49 yıl	10 (%2.6)	368 (%97.4)	
≥ 50 yıl	16 (%3.0)	512 (%97.0)	
<b>*Medeni durum</b>			p>0.05
<b>Evli</b>	24 (%2.5)	929 (%97.5)	
<b>Dul</b>	8 (%6.3)	120 (%93.8)	
<b>*Evlilik yaşı</b>			p>0.05
12-19 yıl	20 (%3.8)	509 (%96.2)	
20-24 yıl	9 (%2.1)	421 (%97.9)	
≥ 25 yıl	3 (%2.5)	119 (%97.5)	
<b>**Evlilik süresi</b>	31.0 (23.0 37.0)	28.0 (20.0 35.0)	p>0.05
<b>**Evlilik sayısı</b>	1.0 (1.0 1.0)	1.0 (1.0 1.0)	p>0.05
<b>*Partner sayısı</b>			p>0.05
Tek	30 (%2.9)	1000 (%97.1)	
>1	2 (%3.9)	49 (%96.1)	
<b>*Öğrenim süresi</b>			p>0.05
12 yıl ve altı	30 (%3.0)	955 (%97.0)	
12 yıl üzeri	2 (%2.1)	94 (%97.9)	
<b>*Sigara kullanımı</b>			<b>P&lt;0.05</b>
Kullanan	<b>13 (%5.2)</b>	<b>239 (%94.8)</b>	
Kullanmayan	19 (%2.3)	810 (%97.7)	
<b>** Gebelik sayısı</b>	4.0 (3.0 5.0)	3.0 (2.0 4.0)	p>0.05
<b>** Doğum sayısı</b>	<b>3.0 (2.0 3.0)</b>	<b>2,0 (2.0 3.0)</b>	<b>P&lt;0.05</b>
<b>*Menopozda olanlar</b>	16 (%3.1)	500 (%96.9)	p>0.05
<b>*Üretken çağ korunma yöntemi</b>			<b>P&lt;0.05</b>
Yok	6 (%5.9)	96 (%94.1)	
RIA	3 (%2.7)	110 (%97.3)	
<b>OKS</b>	<b>3 (%11.1)</b>	<b>24(%88.9)</b>	
Koitus interruptus	2 (%1.5)	129 (%98.5)	
Kondom	2 (%1.6)	122 (%98.4)	
Diğer	0(%0.0)	68 (%100)	
<b>*Yaşadığı yer</b>			
Kırsal	0	31	p>0.05
İl	32	1018	

\* Ki Kare \*\* Mann Whitney U

HC 2 test sonucu pozitif olan kadınların yaş ortalaması  $49.38 \pm 9.20$  yıl, evlilik süreleri ortalaması  $28.88 \pm 12.06$  yıl, evlilik yaşı ortalaması  $19.38 \pm 3.36$  yıl olup araştırma grubunu oluşturan tüm kadınların ortalama değerleri ile paralellik göstermektedir.

Tablo 4.7’de görüldüğü gibi HC 2 pozitifliği; daha genç yaşta olan kadınlarda (30-39 yıl 6 kadın %3.4), dullarda (8 kadın %6.3), evlilik yaşı daha erken olanlarda (12-19 yıl 20 kadın %3.8), evlilik sayısı 1’den fazla olanlarda (2 kadın %3.9), eğitim süresi 12 yıl ve altında olanlarda (30 kadın %3.0) ve ilde yaşayanlarda (32 kadın %3.0) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte daha fazla oranda saptanmıştır.

HC 2 testi pozitifliği partner sayısına göre değerlendirildiğinde; tek partneri olanlarda HC 2 testi pozitif olanların sayısı 30 (%2.9) iken; partner sayısı 1’den fazla olanlar arasında HC 2 testi pozitif olanların sayısı 2 (%3.9) olarak saptanmıştır. Partner sayısı 1’den fazla olan kadınlarda HC 2 HPV pozitifliği oranı artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Sigara kullanımı açısından bakıldığında sigara kullanan kadınlardan 13 (%5.2)’ü, sigara kullanmayan kadınlardan ise 19 (%2.3)’ü HC 2 testi ile HPV pozitif saptanmıştır. Sigara içen grupla sigara içmeyen grup arasında HC 2 testi HPV pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

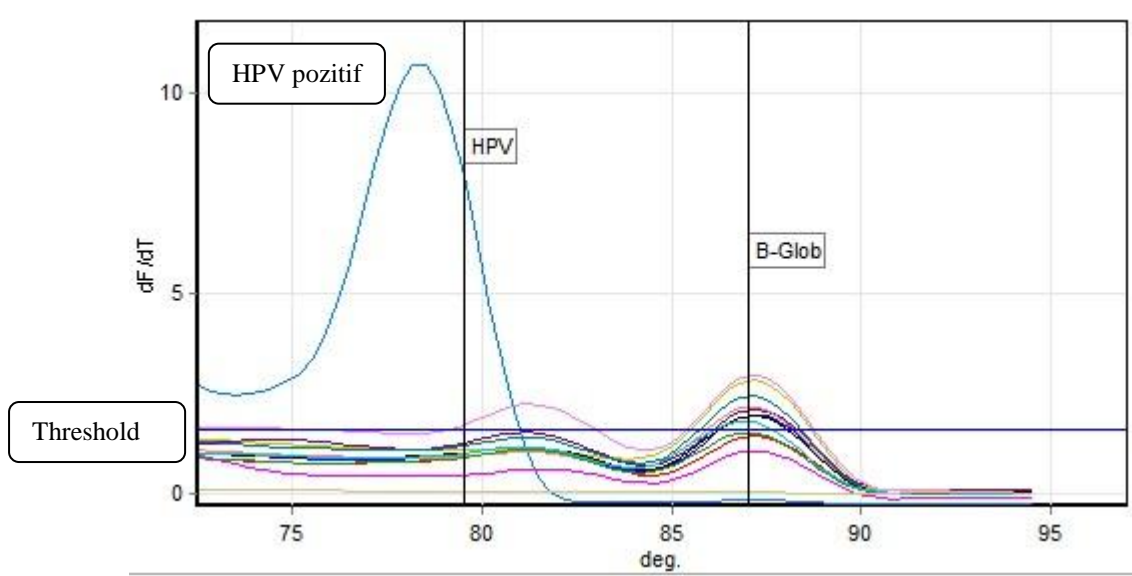
Gebelik ve doğum sayılarının ortanca değeri Tablo 4.7’de görüldüğü gibi olup doğum sayısı fazla olanlarda HC 2 testi ile HPV saptanması istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ).

Kadınların 516 (%47.7)’sı menopozda olduğu için herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmamaktadırlar. Menopozdaki kadınlar arasında HC 2 testi pozitiflik sayısı 16 (%3.1) iken, üretken çağıdaki 565 kadının HC 2 testi ile HPV pozitiflik sayısı ise 16 (%2.8) olarak belirlenmiş olup aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Üretken çağda olup herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmayan 102 kadından HC 2 testi ile pozitif saptananların sayısı 6 (%5.9) iken herhangi bir yöntemle korunan 463 kadından HC 2 testi ile pozitif saptananların sayısı 10 (%2.2) olarak bulunmuştur. Üretken çağıdaki kadınlarda HC 2 ile en yüksek HPV pozitiflik oranı oral kontraseptif (OKS) kullanan (3 kadın %11.1) kadınlarda saptanmıştır. Üretken çağıdaki kadınlardan, herhangi bir korunma yöntemi

kullanmayanlar veya OKS dışında bir yöntemle korunanlarla, OKS yöntemi ile korunanlar arasında HC 2 ile HPV pozitifliği açısından istatistiksel olarak fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

#### 4.2. Konsensus Real-Time PCR, HC 2 ve Pap Testi Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve Pozitif Bulunan Örneklerin Pyrosequencing Yöntemi ile Tiplendirme Sonuçları

Araştırmaya katılan kadınlar arasından rastgele seçilen 152 kadının (32 HC 2 pozitif kadınların tümü alındı) servikal örneklerinde Papsmear ve HC 2 testlerine ek olarak konsensus Real-Time PCR ile HPV taraması yapılmış, tarama sonrasında pozitif saptanan örnekler pyrosequencing yöntemi ile dizi analizi yapılarak tiplendirilmiş ve bu üç yöntemin sonuçları birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

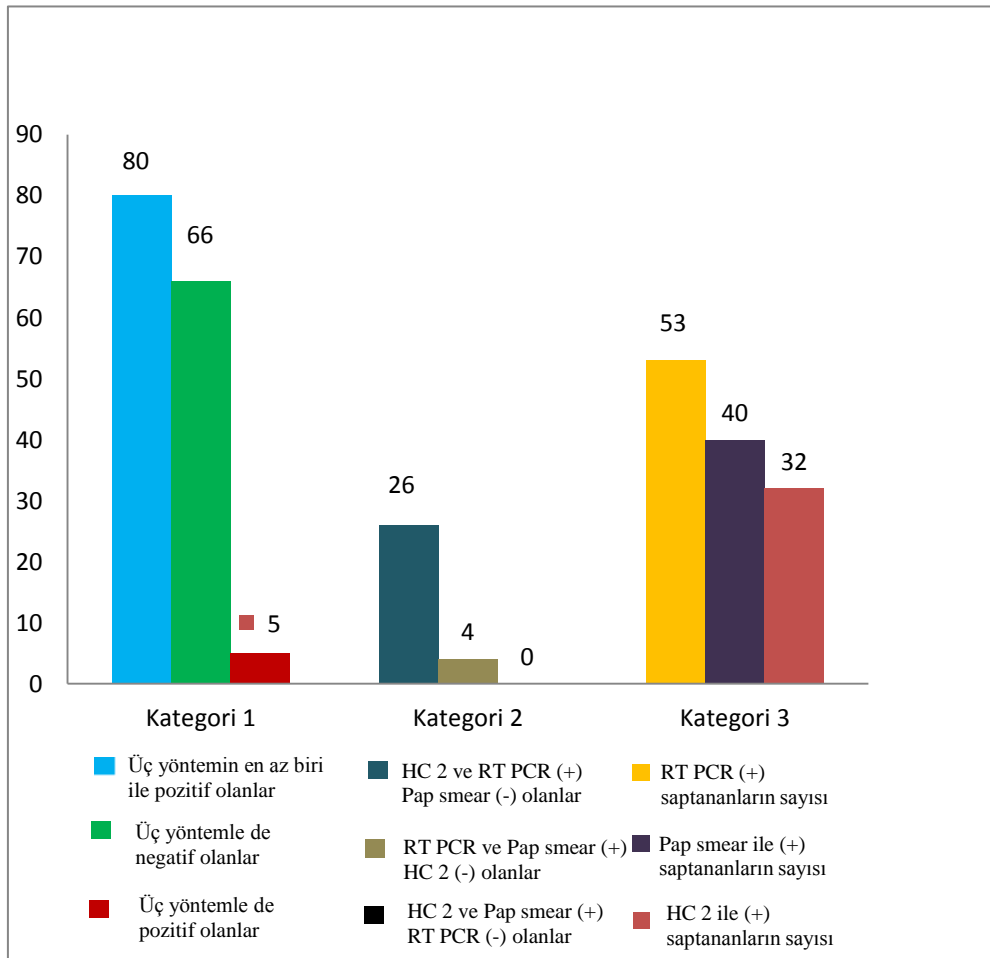


Şekil 4.1. Konsensus Real-Time PCR görüntüsü

Rastgele seçilen 152 kadının yaş aralıkları 30-64 yıl arasında olup yaş ortalaması  $47.93 \pm 7.90$  yıl, evlilik yaşları ise 12-32 yıl arasında olup ortalama evlilik yaşı  $19.82 \pm 4.10$  yıl olarak saptanmıştır. Araştırmaya katılan kadınların evlilik süreleri 2-49 yıl arasında değişmektedir ve ortalama evlilik süresi  $25.91 \pm 9.84$  yıl olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Rastgele seçilen kadın grubunda bazı değişkenlerin ortalama değerleri

Değişken	Min (yıl)	Maks (yıl)	Ortalama (yıl)	Std. sapma
Yaş	30	64	47.93	7.90
Evlilik yaşı	12	32	19.82	4.10
Evlilik süresi	2	49	25.91	9.84



Şekil 4.2. 152 kadından oluşan araştırma grubunda yöntemlere göre pozitiflik ve negatiflik sayıları

Araştırma grubundaki kadınların 80 (%52.6)'i konsensus Real-Time PCR, HC 2 ve/veya Pap smear testlerinden en az biri ile pozitif saptanmıştır. Her üç yöntemle de pozitif saptananların sayısı 5 (%3.3), her üç yöntemle de negatif

saptananların sayısı ise 66 (%43.4)'dir. Aynı grubun 26 (%17.1)'sında HC 2 ve konsensus Real-Time PCR pozitif iken Pap smear sonucu negatif, 4 (%2.6)'ünde Pap smear ve konsensus Real-Time PCR pozitif iken HC 2 negatif olarak bulunmuş, Pap smear ve HC 2 pozitifken konsensus Real-Time PCR'ın negatif olduğu hiçbir örnek bulunamamıştır. Çalışılan 152 örnekten 40 (%26.3)'ü Pap smear testi ile, 32 (%21.1)'si HC 2 testi ile, 53 (%34.9)'ü de konsensus Real-Time PCR ile tek başına ve/veya birlikte pozitif bulunmuştur. Kadınlardan 3 (%2.0)'ünün ise Pap smear sonucu yetersiz yayma nedeniyle değerlendirilememiş; bunlardan 1 (%33.3)'i HC 2 testi ile low risk HPV olarak saptanmış, pyrosequencing ile tip 11 HPV olarak tiplendirilmiştir. Diğer 2 kadının HC 2 ve konsensus Real-Time PCR sonucu ise negatif olarak belirlenmiştir. Sadece konsensus Real-Time PCR ile pozitif olanların sayısı 17 (%11.2), sadece Pap smear testi ile pozitif olanların sayısı 31 (%20.4) iken sadece HC 2 ile pozitif olan örnek yoktur (Şekil 4.2).

Bu grubu oluşturan 152 kadının 32 (%21.1)'sinin servikal örneğinde HC 2 testi ile HPV varlığı saptanmıştır. Bunlardan 22 (%68.8)'si yüksek riskli tiplerin, 9 (%28.1)'u düşük riskli tiplerin, 1 (%3.1)'i de hem yüksek hem düşük riskli tiplerin olduğu gruba ait olarak sınıflandırılmıştır. Konsensus Real-Time PCR ile yapılan çalışmada ise 53 (%34.9) örnekte HPV saptanmıştır. Pozitif saptanan bu 53 örneğin 44 (%83.0)'ünde HPV tipleri belirlenmiş, 9 (%15.1) örnekte HPV saptanmış ancak tip belirlenememiştir. HC 2 testi ile pozitif saptanan 32 örneğin ise 30 (%93.8)'u pyrosequencing yöntemi ile tiplendirilmiş, 2 (%6.2)'si konsensus Real-Time PCR ile HPV DNA pozitif saptanmış fakat tiplendirilememiştir. Diğer taraftan konsensus Real-Time PCR ile pozitif saptanan 21 örnek ise HC 2 testi ile negatif saptanmış, pyrosequencing ile bunların 14 (%66.7)'ü tiplendirilmiş, 7 (%33.3)'sinde tip belirlenememiştir. Pyrosequencing ile tiplendirilen örneklerin 20 (%45.5)'si yüksek risk HPV grubunda, 12 (%27.3)'si muhtemel yüksek risk HPV grubunda, 8 (%18.2)'i düşük risk HPV grubunda, 4 (%9.1)'ü birden fazla tip HPV grubunda HPV tipleriyle pozitif saptanmıştır. Birden fazla tipte pozitif saptanan 4 örneğin 3'ünde tiplerden en az biri yüksek riskli olarak belirlenmiştir (Tablo 4.9).

Pyrosequencing'de yüksek risk olarak belirlenen 18 örneğin 16 (%88.9)'sı HC 2 testinde de yüksek risk grubunda saptanırken; 1 (%5.6) örnek düşük risk grubunda, 1 (%5.6) örnek de hem yüksek risk hem düşük risk grubunda saptanmıştır.

Pyrosequencingde muhtemel yüksek riskli grupta saptanan 12 örnekten 7 (%58.3)'si HC 2 testinde negatif olarak saptanırken 3 (%25.0) örnek düşük risk grubunda, 2 (%16.7) örnek ise yüksek risk grubunda olarak belirlenmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Konsensus Real-Time PCR ve/veya HC 2 testi ile pozitif saptanan 53 örneğin HPV risk grubu (yüksek/muhtemel yüksek/düşük risk) dağılımı

HC 2 testi	Konsensus Real-Time PCR+Pyrosequencing					Toplam
	Yüksek risk	Muhtemel yüksek risk	Birden fazla tip	Düşük risk	Tiplendirilemeyen	
Yüksek risk	16	2	3	0	1	22
Düşük risk	1	3	0	4	1	9
Yüksek/Düşük risk	1	0	0	0	0	1
Negatif	2	7	1	4	7	21
<b>Toplam</b>	20	12	4	8	9	53

HC 2 yöntemi sonuçları ile pyrosequencing yönteminde saptanan tip dağılımlarının karşılaştırması Tablo 4.10'da görülmektedir. Pyrosequencing ile yapılan çalışmada tip 16 en çok karşılaşılan tip olmuştur. Konsensus Real-Time PCR ile pozitif saptanıp pyrosequencing ile tiplendirilebilen 44 örneğin 12 (%27.3)'sinde tip 16 tek başına saptanırken; 3 (%6.8) örnekte bir başka tiple beraber (tip 16+tip33, tip 16+tip70 ve tip16+tip90) saptanmıştır. Toplamdaki tip 16 sayısı ise 15 (%34.1) olup en çok saptanan tip olarak belirlenmiştir. Bunu 11 (%25.0) örnekle tip 90, 4 (%9.1) örnekle tip 18 izlemektedir.

Tablo 4.10. Konsensus Real-Time PCR ve/veya HC 2 yöntemi ile pozitif saptanan örneklerin, Pyrosequencing yöntemi ile belirlenen genotip dağılımı

Genotip dağılımı	Konsensus Real-Time PCR pozitif (53)	
	HC 2 Negatif (21)	HC 2 pozitif (32)
<b>Yüksek riskli genotipler</b>		
16 (n=12)	1	11
18 (n=4)	0	4
51 (n=2)	1	1
56 (n=1)	0	1
58 (n=1)	0	1
<b>Birden fazla genotiple pozitif olanlar</b>		
16, 33 (n=1)	0	1
16, 70 (n=1)	0	1
16, 90 (n=1)	0	1
70, 90 (n=1)	1	0
<b>Muhtemel yüksek riskli genotipler</b>		
66 (n=3)	3	0
90 (n=9)	4	5
<b>Düşük riskli genotipler</b>		
6 (n=2)	0	2
11 (n=1)	0	1
34 (n=2)	2	0
42 (n=1)	0	1
70 (n=2)	2	0
<b>Tiplendirilemeyen (n =9)</b>	7	2
<b>HPV DNA (-) (n=99)</b>	99	0



Tablo 4.11. Papsmear sonuçları ile genotip dağılımlarının karşılaştırılması

HPV tip	Papsmear					
	Negatif	Yetersiz yayma	ASCUS	AGUS	LGSIL	HGSIL
<b>Yüksek riskli genotipler</b>						
16 (n=12)	9		1		1	1
18 (n=4)	4					
51 (n=2)			1			1
56 (n=1)	1					
58 (n=1)	1					
<b>Birden fazla genotiple pozitif olanlar</b>						
16, 33 (n=1)			1			
16, 70 (n=1)	1					
16, 90 (n=1)	1					
70, 90 (n=1)	1					
<b>Muhtemel yüksek riskli genotipler</b>						
66 (n=3)	2		1			
90 (n=9)	8		1			
<b>Düşük riskli genotipler</b>						
6 (n=2)	1		1			
11 (n=1)		1				
34 (n=2)	2					
42 (n=1)	1					
70 (n=2)	2					
<b>Tiplendirilemeyen (n=9)</b>	9					
<b>HPV DNA (-) (n=99)</b>	66	2	27	3	0	1

Araştırma grubunun ikinci kısmını oluşturan 152 kadının 40 (%26.3)'unda Pap smear sonucu pozitif olarak saptanmıştır. Bu 40 örneğin ise 9 (%22.5)'unda konsensus Real-Time PCR ile HPV DNA varlığı gösterilirken 31 (%77.5) örnekte HPV DNA varlığı gösterilememiştir. Pozitif saptanan 9 örneğin ise pyrosequencing ile 3 (%33.3)'ü tip 16, 2 (%22.2)'si tip 51, 1 (%11.1)'i tip 66, 1 (%11.1)'i tip 90, 1 (%11.1)'i tip 6, 1 (%11.1)'i ise tip 16 ve tip 33 olarak tiplendirilmiştir (Tablo 4.11).

Pyrosequencing'de yüksek risk tip içeren toplam 23 örnekten 17'si (%73.9) Pap smear testinde, farklı 2'si (%8.7) ise HC 2 testinde negatif olarak saptanmıştır. HC 2 testi ile negatif olarak belirlenen bu iki örnekten birinin Pap test sonucu LGSIL olarak, diğerinin sonucu ise HGSIL olarak rapor edilmiştir. Pap testi sonucu HGSIL olarak raporlanan 1 örnekte ise hem konsensus Real-Time PCR'da hem de HC 2 testinde HPV varlığı gösterilememiştir.

## 5.TARTIŞMA

Human papillomavirus (HPV), *Papillomaviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan, çift iplikli DNA'ya sahip zarfsız bir virustur. HPV'nin neden olduğu enfeksiyonlar, dünya genelinde en çok görülen seksüel geçişli hastalıklar arasındadır. Başlıca risk faktörleri; erken yaşta cinsel aktivite, birden fazla partnerle cinsel ilişki ya da partnerin çok partnerle ilişki öyküsüdür [5, 71, 86].

Kapsid proteinlerini kodlayan L1 gen dizileri temel alınarak yapılan sınıflandırmada 200'den fazla tipi olduğu belirlenmiştir. HPV tipleri, enfeksiyon oluşturdıkları bölge ve doku tropizmine göre kutanöz ve mukozal (genital) tipler olarak sınıflandırılırlar. Genital bölgede enfeksiyon oluşturan HPV'lerin bazı tiplerinin servikal karsinoma veya öncü lezyonlarına neden olduğu bilinmektedir [5, 71].

Genital enfeksiyonlara neden olan HPV tipleri kanser yapıcı potansiyellerine göre; düşük riskli tipler, muhtemel yüksek riskli tipler ve yüksek riskli tipler olarak gruplandırılmaktadır. Yüksek riskli tipler ve muhtemel yüksek riskli tipler serviksin skuamöz hücreli kanserleri ve öncü lezyonlarıyla ilişkili olduğundan HPV enfeksiyonlarının saptanması ve tiplerinin belirlenmesi servikal kanser gelişiminin önlenmesi ve takibi açısından önemlidir. Bunun için riskli kişileri belirlemede ve takiplerinde; HPV varlığının ve etken tipin belirlenmesinin, rutin sitolojik taramalara ek olarak uygulanması uluslararası kabul görmüştür [5, 86].

HPV standart hücre kültürü sistemlerinde üretilmemekte, serolojik testler ise tanıda kısıtlı olarak kullanılabilir. Bu nedenle klinik örneklerde HPV varlığının saptanması ve tiplendirilmesi için nükleik asit testleri (NAT) kullanılmaktadır. HPV'nin tanımlanmasında farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır; fakat günümüzde altın standart kabul edilen yöntem DNA dizi analizidir [5, 11].

Araştırmamız, Eskişehir Bölgesi'nde yaşayan ve servikal kanser taraması için Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi'ne (KETEM) başvuran, 30-65 yaş arası, herhangi bir klinik yakınması olmayan 1081 kadın grubunda yapılmıştır. Öncelikle araştırma grubundaki kadınların tamamından alınan örnekler Pap smear ve Hybrid Capture 2 (HC 2) testleri ile çalışılmış, iki yöntemin sonuçları birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Daha sonra, HC 2 ile pozitif saptanmış olan örneklerin tamamının

olduğu ve rastgele seçilen örneklerle birlikte 152 kadın grubundan oluşan ikinci bir grupta konsensus Real-Time PCR ile çalışılmış, pozitif çıkan sonuçlar pyrosequencing yöntemi ile tiplendirilmiştir. Böylece hem yöntemler birbirleriyle kıyaslanmış hem de Eskişehir Bölgesi'ndeki HPV prevalansı hakkında fikir edinilmesi amaçlanmıştır.

HPV prevalansının belirlenmesi için farklı popülasyonlarda farklı yöntemlerle araştırmalar yapılmıştır. Toplam 78 çalışmanın verileri kullanılarak yapılan bir meta analizde normal sitolojiye sahip kadınlar arasında global HPV prevalansı %10.4 olarak bulunmuş ve bölgeler arasında önemli varyasyon saptanmıştır. En yüksek prevalans %22.1 oranıyla Afrika'da saptanırken Orta Amerika ve Meksika'da %20.4, Kuzey Amerika'da %11.3, Avrupa'da %8.1 ve Asya'da %8 olarak belirlenmiştir [37]. Avrupa ülkelerinde 18 çalışmanın verilerinin kullanıldığı meta analizde 30-64 yaş arası kadınlarda yüksek riskli HPV prevalansı İspanya'da %2 iken Belçika ve Fransa'da yaklaşık %12'ye kadar ulaşmaktadır [87].

Finlandiya'da Leinonen ve arkadaşları 2003-2004 yılları arasında, 25-65 yaş arası 16.895 kadında HC 2 testi ile yaptıkları çalışmada yüksek riskli HPV prevalansını %7.5 olarak saptamışlardır [88]. Yunanistan'da Kroupis ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada servikal sitolojisi normal olan kadınların %23.6'sında HPV DNA varlığı gösterilmiştir [89]. Çin'de (Asyalı kadınlarda) Bao ve arkadaşlarının yaptıkları, servikal sitolojisi normal olan 16.803 kadını kapsayan çalışmada ise HPV prevalansı %14.4 olarak saptanmıştır [90]. İran'da Ghaffari ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada, servikal sitolojisi normal olan 77 hastanın 10'unda HPV DNA pozitifliği saptanmış ve bu gruptaki HPV DNA pozitiflik oranı %13 olarak bulunmuştur [91]. Rusya, Belarus ve Litvanya'yı kapsayan bölgede Kulmala ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada, tarama grubunda HPV prevalansı %27.2 olarak bildirilmiştir [92]. Meksika'da Anguiano ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmada, 498 hastadan alınan örneklerde HPV DNA PCR yöntemiyle 24 (%4.8) hastada HPV DNA pozitifliği saptanmıştır [93].

Ülkemizde bu konuda ilk çalışmalardan birini 1994 yılında Vardar ve arkadaşları yapmış olup benign servikal lezyonu olan 176 hastanın %16.4'ünde HPV pozitifliği saptamışlardır [94]. Altuğlu ve arkadaşlarının 2002 yılında, Hybrid Capture

yöntemi ile yaptıkları araştırmada, mukopürülan endoservisit tanısı almış 148 hastanın 8 (%5.4)'inde HPV DNA varlığı belirlenmiştir [95]. Özşaran ve arkadaşları 2003 yılında yapıkları araştırmada, 1100 hastanın 34'ünde skuamöz hücre anomalisi saptanmış ve bunların 15 tanesi ASCUS, 16 tanesi LGSIL, 3 tanesi HGSIL olarak rapor edilmiştir. Araştırma grubundaki 5 hastada ise Hybrid Capture yöntemi ile HPV DNA tespit edilmiştir [96]. Özçelik ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları araştırmada ise 230 kadının 14 (%6.1)'ünde Hybrid Capture 1 yöntemi ile HPV DNA varlığı belirlenmiştir [97]. İnal ve arkadaşlarının Türkiye'de 2002-2005 yılları arasında, HC 2 testini kullanarak yaptıkları ve servikal intraepitelyal lezyon ile HPV ilişkisinin araştırıldığı, 1353 kadını içeren çalışmada HPV DNA pozitifliği % 2.1 oranında saptanmıştır [98]. Ardıç ve arkadaşları, 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında, şüpheli lezyonu bulunan 57 kadının servikal sürüntü örneklerinde yüksek riskli HPV tiplerine ait E6/E7 mRNA'larını otomatize NASBA sistemiyle araştırmışlar ve 22 (%38.6) örnekte HPV E6/E7 RNA'sı saptamışlardır [86]. Dursun ve arkadaşlarının 403 normal sitolojili hastada yaptıkları çalışmada %20 oranda HPV pozitifliği görülmüştür [99]. Özalp ve arkadaşları 2011 yılında Eskişehir'de 615 poliklinik hastasında yaptıkları araştırmada 26 (%4) hastada HPV DNA pozitifliği saptamışlardır [106].

Bizim araştırma grubumuzu oluşturan 1081 kadında, HC 2 yöntemi ile HPV DNA varlığı %3.0 (32 kadın) olarak belirlenmiş olup ülkemizde bu konuda daha önce yapılmış olan çalışmalarla uyumlu görünmektedir. Sadece yüksek riskli HPV pozitif olan kadınların oranı ise %2.1 (23 kadın) olarak hesaplanmıştır. Bölgemizdeki düşük HPV oranı sosyokültürel özellikler ve kadınlarda tek eşliliğin yaygın olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Araştırmalar sonucunda görülmektedir ki farklı ülkelerde, hatta ülkemizin farklı bölgelerinde HPV DNA pozitiflik oranları, kullanılan yöntemlere ve seçilen araştırma popülasyonunun özelliklerine göre farklılıklar göstermektedir. Bazı yayınlarda ülkemizdeki HPV prevalansının %2-80 arasında değiştiği bildirilmektedir. Bu kadar değişken sonuçlarla karşılaşılmasının çeşitli nedenleri olabilir. Çalışma için kaliteli örnek alımı çok önemlidir. İyi alınmamış, az hücre içeren servikal sürüntü örneklerinde, ekstraksiyon sırasında DNA kaybı gibi durumlarda, hemoglobin gibi bazı

inhibitör proteinlerin varlığında DNA saptama olasılığı düşebilir. Ayrıca çalışılan yöntemlerin duyarlılıklarındaki farklılık da sonuçları etkileyebilir [86, 101].

Bazı araştırmalarda HPV enfeksiyonu risk faktörleri arasında, erken yaşta evlenme veya ilk cinsel ilişki yaşının küçük olması yer almaktadır. O'Keefe ve arkadaşları ise 16-19 yaşları arasında seksüel aktif kadınları dahil ettikleri çalışmalarında ilk koit yaşı ile HPV DNA arasında anlamlı bir ilişkiye ulaşamadıklarını bildirmişlerdir [102]. Sanjose ve arkadaşlarının İspanya'da yaptıkları çalışmada ilk cinsel ilişki yaşı 18 yaşın altında olanlarda HPV DNA saptanma riski artmış olarak bulunmuştur [103].

Ülkemizde olduğu gibi bireylerin ilk cinsel deneyimini evlenme ile yaşadığı Endonezya'da yapılan çalışmada 18 yaş altında evlenen 505 kadından 449'u HPV negatif bulunmuş; ilk cinsel ilişki yaşı ile HPV pozitifitesi arasında anlamlı derecede ilişkili saptanamamıştır [104]. Araştırma grubumuzdaki kadınlarda da evlilik yaşı ilk cinsel ilişki yaşı olarak değerlendirilmiş ve evlilik yaşı daha erken olanlarda (12-19 yaş 20 kadın %3,8) HC 2 ile HPV DNA varlığı daha yüksek oranda saptanmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Belçika'da az riskli ve çok riskli kadınlardaki HPV prevalansının araştırıldığı bir çalışmada, az riskli olarak kabul edilen genel toplumda HPV prevalansı %14.3 iken, çok riskli olarak kabul edilen seks işçilerinde ise bu oran %34.4 olarak bulunmuştur [105]. Volkov ve arkadaşlarının Rusya'da yaptıkları çalışmada seksüel partner sayısı ile yüksek riskli HPV DNA pozitifliği arasında anlamlı ilişki saptanmıştır [106]. Arjantin'de Matos ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yaşam boyu 3'ten fazla seksüel partneri olan kadınlarda tek partnerli kadınlara göre HPV DNA pozitifliğinin 3 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir [107]. İspanya'da Sanoje ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma da birden fazla partner sayısının HPV DNA pozitifliği için bir risk faktörü olduğu desteklenmektedir [103].

Toplumumuzda cinsel hayatı sorgulamak kolay olmamakla birlikte anket sonuçlarımızda partner sayısı ve evlilik sayıları eşit olarak saptanmıştır. Bizim araştırma grubumuzdaki kadınlarda partner sayısı birden fazla olanlarda HC 2 ile HPV varlığı daha yüksek oranda (1'den fazla olanlarda %3.9; tek olanlarda %2.9) saptanmış olmakla birlikte partner sayısının tek olması ile birden fazla olması arasında HPV DNA pozitifliği açısından anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ).

Sigara kullanımı açısından bakıldığında sigara kullanan kadınlardan 13 (%5.2)'ü, sigara kullanmayan kadınlardan ise 19 (%2.3)'ü HC 2 testi ile HPV pozitif saptanmıştır. Sigara içen grupla sigara içmeyen grup arasında HC 2 testi HPV pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Castle ve arkadaşları, risk faktörlerini değerlendirdikleri çalışmalarında sigara kullanımının HPV enfeksiyonu riskini artırdığını vurgulanmışlardır [108]. Volkov ve arkadaşlarının Rusya'da yaptıkları araştırmada da sigara HPV enfeksiyonu için bir risk faktörü olarak bildirilmiştir [106]. Nyari ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, HPV prevalansını araştırdıkları 728 Macar kadınında, sigara kullanmayı HPV için bir risk faktörü olarak belirtmişlerdir [109].

Yapılan çalışmalarda doğum sayısı ile HPV DNA pozitifliği arasında değişik sonuçlar elde edilmiştir. Tuncer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada HPV DNA pozitifliği ile parite sayısı arasında bir korelasyon tespit edemediklerini bildirmişlerdir [110]. Buna rağmen Pereira ve arkadaşlarının Brezilya'da 201 kadın üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise üç ya da daha fazla parite sayısının genç kadınlarda HPV enfeksiyonu pozitifliğinin artışı yönünde bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir [111]. Franceschi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise yine yüksek parite, erken menopoz gibi faktörler HPV enfeksiyonu ve dolayısı ile servikal in situ karsinoma ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur [112]. Sapy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da multiparite, HPV enfeksiyonu sıklığını arttıran faktörlerden birisi olarak değerlendirilmiştir [113].

Bizim araştırmamızda ise HC 2 testi ile HPV DNA pozitif saptananlarda doğum sayısının fazla olduğu belirlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bu konuda yeni çalışmalar yapılması uygun olabilir.

İspanya'da Sanjose ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada boşanmış kadınlarda evli kadınlara göre HPV DNA prevalansı 6.7 kat daha yüksek bulunmuştur [103]. Stacy ve arkadaşlarının ABD'de 57 - 85 yaş arası kadınlarda yaptıkları bir çalışmada ise yüksek risk HPV prevalansı evli olanlarda % 3.6 iken boşanmış olan kadınlarda % 13.6 olarak bulunmuştur [114].

Bizim araştırmamızda dullarda (8 kadın %6.3) HPV DNA pozitifliği evli (24 kadın %2.5) olanlara göre daha yüksek oranda saptanmış fakat iki grup arasında

HPV DNA pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ).

Araştırma grubumuzdaki kadınlar, eğitim süreleri açısından da sorgulanmışlar ve buna göre; eğitim süresi 12 yıl veya altı ve 12 yıl üzeri olan iki gruba ayrılmışlardır. Smith ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, 12 yıl ve daha az eğitim süresine sahip hastalarda HPV pozitifliğini %15.7, 12 yıldan fazla eğitim süresi olanlarda ise %11.5 oranında bulmuşlardır [115]. Yine Smith ve arkadaşlarının yaptığı farklı bir çalışmada 12 yıl ve altı eğitim süresine sahip 48 hastanın %16.7'sinde HPV pozitifliği saptanmış, 12 yıl üzeri eğitim almış olan 57 hastanın ise %17.3'ünde pozitiflik görülmüştür [116]. Arjantin'de Matos ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise eğitim durumu genç kadınlar arasında HPV enfeksiyonu için risk faktörü olarak gösterilmiş; üniversite okuyanlarda HPV DNA pozitifliğinin daha az olduğu bildirilmiştir. Bu durumun eğitilmiş kadınlarda partner karakteri veya cinsel hijyenin göstergesi olabileceği belirtilmiştir [107].

Bizim araştırmamızda HPV DNA pozitifliği, 12 yıl ve altı eğitim süresine sahip kadınlarda (30 kadın %3.0) 12 yıl üzeri eğitim süresine sahip kadınlara (2 kadın %2.1) göre daha yüksek oranda saptanmış olup aralarında HPV pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ).

De Sanjose ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı, 70 ülkeden 346.000 kadının değerlendirildiği geniş çaplı bir çalışmada, yaşa bağlı HPV prevalansında bölge ve popülasyona göre farklılık saptanmıştır. Bölgelerin çoğunda HPV sıklığı 25 yaş civarında artmakta, daha yaşlı gruplarda azalma gözlenmektedir. Bazı bölgelerde ise yeni edinilmiş enfeksiyona bağlı veya reaktif olmuş latent enfeksiyona bağlı ileri yaşlarda bir yükseliş gözlenmiştir [37]. Smith ve arkadaşlarının 2008'de yaptığı çalışmada ise yaşa bağlı HPV pozitifitesi U şeklinde bir eğri olarak göze çarpmakta, genç yaşlarda bulunan yüksek oran daha ileri yaşlarda düşmekte ve yaşlı grupta tekrar bir yükseliş gözlenmektedir [117].

Bizim araştırmamızda da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte HPV DNA pozitifliğinin daha genç yaş grubundaki kadınlar arasında (30-39 yaş 6 kadın %3.4) en yüksek oranda olduğu saptanmıştır ( $p>0.05$ ). Sonrasında (40-49 yaş 10 kadın %2.6) HPV pozitiflik oranının azaldığı fakat daha ileri yaş grubunda ( $\geq 50$  yaş 16 kadın %3.0) yeni bir yükselme görüldüğü belirlenmiştir.



Oral kontraseptifler (OKS) servikal ektopiyi dolayısıyla hücrel ektopiyi ve hücrel proliferasyonu artırarak HPV'nin viral ekspresyonunu sağlamakta ve tespitini kolaylaştırmaktadır [118]. Herrero ve arkadaşlarının Kostarika yaptıkları çalışmada da hastalarda OKS kullanımının HPV pozitifliğini artıran bir faktör olduğu gözlenmiştir [119]. Diane ve arkadaşları yaptıkları çalışmada HPV ile OK kullanımı arasında anlamlı bir ilişki saptamadıklarını bildirmişlerdir [120]. İtalya'da 503 asemptomatik kadının katıldığı bir çalışmada ise, sigara ve OK kullanımı ile HPV infeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir [121].

Araştırma grubumuzdaki kadınların 516 (%47.7)'sı menopozda olduğu için herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmamaktadırlar. Menopozdaki kadınlar arasında HC 2 testi pozitiflik sayısı 16 (%3.1) iken üretken çağıdaki 565 kadının HC 2 testi ile HPV pozitiflik sayısı ise 16 (%2.8) olarak belirlenmiş olup aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Üretken çağda olup herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmayan 102 kadından HC 2 testi ile pozitif saptananların sayısı 6 (%5.9) iken; herhangi bir yöntemle korunan 463 kadından HC 2 testi ile pozitif saptananların sayısı 10 (%2.2) olarak bulunmuştur. Üretken çağdaki kadınlarda HC 2 ile en yüksek HPV pozitiflik oranı OKS kullanan (3 kadın %11.1) kadınlarda saptanmıştır. Üretken çağdaki kadınlardan, herhangi bir korunma yöntemi kullanmayanlar veya OKS dışında bir yöntemle korunanlarla, OKS yöntemi ile korunanlar arasında HC 2 ile HPV pozitifliği açısından istatistiksel olarak fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Araştırma grubunu oluşturan kadınların 47 (% 4.3)'sinde Pap smear sonucu pozitif saptanmış, 5 (%0.5) kadının Pap smear testi sonucu değerlendirme için yetersiz olarak raporlanmıştır. Bethesda sistemine göre raporlanan pozitif Pap smear testi sonuçlarının dağılımları; ASCUS (40 kadın %3.7), AGUS (3 kadın %0.3), HGSIL (3 kadın %0.3), LGSIL (1 kadın %0.1) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçların, Pap smear testi pozitif olarak değerlendirilmiş olan 47 kadın grubundaki oransal dağılımı ise; 40 (%85.1) ASCUS, 3 (%6.4) AGUS, 3 HGSIL (%6.4) ve 1 (%2.1) LGSIL şeklindedir. Pap smear testi sonucu pozitif saptanan bu 47 kadının 5 (%10.6)'inde HC 2 testi ile HPV varlığı belirlenmiştir. Pap smear ve HC 2'nin testlerinin birlikte pozitif olarak raporlandığı kadınların, araştırma grubunu oluşturan tüm kadınların içindeki oranı ise %0.5 (5 kadın) olarak hesaplanmıştır.

İki testin de pozitif olarak belirlendiği 5 kadının Pap smear ve HC 2 sonuçları dağılımı şu şekildedir; ASCUS olanların 3 (%7.5)'ünde yüksek riskli HPV, 1 (%2.5)'inde düşük riskli HPV; HGSIL olanların 1 (%33.3)'inde yüksek riskli HPV saptanmıştır. Pap smear testi sonucu; ASCUS olarak raporlanan 36 örnekte, AGUS olarak raporlanan 3 örnekte, HGSIL olarak raporlanan 2 örnekte ve LGSIL olarak raporlanan 1 örnekte HC 2 testi ile HPV varlığı belirlenememiştir. Toplam olarak bakıldığında Pap smear testi sonucu pozitif raporlanmış olan 47 örneğin 42 (%89.3)'inde HC 2 yöntemi ile HPV varlığı saptanmamıştır.

Buna karşılık, Pap smear testinde hücresel anormallik izlenmeyen veya Pap smear testi değerlendirmesi için örneğin uygun olmadığı toplam 1034 kadında ise HC 2 yöntemi ile HPV pozitifliği %2.6 (27 kadın) olarak saptanmıştır. Bu grupta sadece yüksek riskli HPV saptanma oranı ise %1.8 (19 kadın) olarak bulunmuştur.

Araştırmamızın ikinci kısmında 152 kadından oluşan grupta Pap smear sonucu pozitif 40 (%26.3) kadın bulunmaktaydı. Bu 40 örneğin Bethesda sistemine göre dağılımı; 33 ASCUS, 3 AGUS, 3 HGSIL, 1 LGSIL şeklinde olup; HC 2 ile 5 (%12.5)'inde HPV varlığı saptanırken konsensus Real-Time PCR ile 9 (%22.5)'unda HPV DNA varlığı gösterilmiştir. HC 2'den farklı olarak konsensus Real-Time PCR ile pozitif saptanan bu 4 örneğin patoloji sonuçları; 1 HGSIL, 1 LGSIL, 2 ASCUS olarak belirlenmiştir. Toplamda, HGSIL saptanan 3 örnekten 2'sinde ve LGSIL saptanan tek örnekte HC 2 ile HPV negatifken; konsensus Real-Time PCR ile HGSIL saptanan 3 örnekten 1'inde HPV DNA varlığı gösterilememiştir. Bu durum, konsensus Real-Time PCR ile negatif saptanan HGSIL örneğinin patolojik olarak yanlış değerlendirilmiş olmasına veya iki yöntemin eş zamanlı alınan farklı servikal sürüntü örneklerinden çalışılmasına bağlı olabilir. Pap smear sonucu LGSIL olan 1 örneğin ve HGSIL olan 1 örneğin, HC 2 ile saptanabilir tipler olmalarına rağmen negatif olarak belirlenmesi ve konsensus Real-Time PCR ile pozitif saptanması da yine eş zamanlı alınan farklı örneklerden çalışılmasına bağlı olabileceği gibi iki yöntem arasındaki duyarlılık farkından da kaynaklanabilir.

Buna karşılık Pap smear sonucu negatif olarak raporlanmış veya değerlendirilememiş olan 44 örnekte konsensus Real-Time PCR ile HPV DNA varlığı saptanmıştır. Bunların 17'sinde yüksek riskli HPV, 11'inde ise muhtemel yüksek riskli HPV belirlenmiştir.

Çeşitli kaynaklarda ASCUS (önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücre) tanısı sıklığının, SIL (skuamöz intraepitelyal lezyon) tanısının 2-3 katından fazla olmaması gerektiği bildirilmiştir. Daha fazla oranlarda ASCUS saptanması durumunda laboratuvarın kalite kontrolünün değerlendirilmesi gerekmektedir. Bizim araştırmamızda araştırma grubunun tamamı (1081 kadın) baz alındığında ASCUS olarak raporlanan örnek sayısı 40 iken SIL olarak raporlanan örnek sayısı ise 4'tür. Örneklerimizdeki ASCUS/SIL oranı 10 olarak hesaplanmış olup Bethesda'nın vermiş olduğu oranın çok üzerindedir. Sitolojik değerlendirmenin sitopatologlar tarafından yapılmamasından kaynaklanıyor olabileceğini düşündüğümüz bu durum ASCUS raporlarının gereksiz fazlalığı ya da SIL'lerin atlanması anlamına gelmektedir ve moleküler yöntemlerle Pap smear testi arasındaki farklılıkları kısmen açıklamaktadır. Bununla birlikte, yöntemlerin, kadınlardan eş zamanlı alınan ayrı örneklerle çalışılmış olması, örnek kalitesi de bu duruma neden olabilir. Ayrıca bazı kadınlarda, yüksek riskli HPV ile enfekte olmalarına rağmen henüz sitolojik bulgular gelişmemiş olabilir. Sonuç olarak; ülkemizde yeterli sayıda sitopatolog olmadığı da göz önüne alındığında riskli hastaların atlanmaması veya gereksiz yere hasta takibi, bunun getireceği fazla maliyet ve hastanın gereksiz yere stres yaşamasının önüne geçilmesi bakımından, servikal kanser taramalarında Pap testi ile birlikte moleküler yöntemlerin de kullanılması gerektiği düşünülebilir [122]. Sadece Pap smear testine göre değerlendirildiklerinde negatif olarak saptanmış olan bu kadınlar riskli grupta olmalarına rağmen, Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneği'nin (ASCCP) önerilerine göre, değerlendirilme ve takipleri açısından eksik kalacaktır. Bu nedenle kadınların servikal kanser için taranmasında Pap smear testine ek olarak moleküler yöntemlerle de taranmaları ve özellikle yüksek riskli genotiplerle enfekte olanların belirlenmesi çok önemlidir.

Araştırmanın ikinci aşamasında, rastgele seçilen 152 kadından (HC 2 ile pozitif saptanan 32 kadın bu gruba dahil edildi) oluşan grupta HC 2 pozitif örnek sayısı 32 (%21.0) iken konsensus Real-Time PCR yöntemi ile 53 (%34.9) örnekte HPV DNA varlığı saptanmıştır. HPV DNA saptanmış olan bu 53 örneğin 32 (%60.4)'si HC 2 yöntemi ile de pozitif saptanmış örneklerden oluşurken 21 (%39.6) örnekte HC 2 ile HPV DNA varlığı saptanamamıştır. Konsensus Real-Time PCR ile pozitif saptanan ancak HC 2'nin negatif olarak belirlediği 21 örneğin 152 kadının

olduğu gruptaki oranı %13.8 olarak hesaplandı. Konsensus Real-Time PCR ile pozitif saptanan örnekler pyrosequencing’de çalışılarak 44 (%83.0)’ünde HPV genotipleri belirlenmiş, 9 (%17.0) örnekte HPV saptanmış ancak genotip belirlenememiştir. Pyrosequencing ile yapılan tiplendirme sonucunda örneklerin 20 (%37.7)’si yüksek risk HPV grubunda, 12 (%20.6)’si muhtemel yüksek risk HPV grubunda, 8 (%15.1)’i düşük risk HPV grubunda saptanmış, 4 (%7.5)’ü birden fazla HPV genotipi ile pozitif bulunmuştur. Çoklu tipte pozitif saptananlardan 3’ünde tiplerden en az biri yüksek riskli olarak belirlenmiştir.

Kulmala ve arkadaşları 2004 yılında, Rusya, Belarus ve Litvanyayı kapsayan bölgede altı farklı klinikte 1511 kadında yaptıkları ve yüksek riskli HPV varlığı saptama açısından HC 2 ile GP05+/GP06+ primerlerini hedef alan bir PCR yöntemini karşılaştırdıkları araştırmada HC 2 testinin pozitiflik oranını %33.7, PCR’ın pozitiflik oranını ise %36.6 olarak bulmuşlardır. Her iki yöntemle de pozitif saptanan örnek sayısı 417 iken her iki yöntemle de negatif saptanan örnek sayısı ise 866 olarak bulunmuş, yöntemlerin uyum derecesi %84.9 (Cohen’s kapa: 0.669) olarak hesaplanmıştır [123]. Almanya’da Klug ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada, 8101 kadında, HC 2 testi ve PCR line blot assay (LBA) yöntemleri ile tip spesifik HPV dağılımını araştırmışlar ve yüksek riskli HPV enfeksiyon prevalansını HC 2 testi ile %6.4, PGMY09/11 PCR LBA testi ile ise %4.3 olarak bulmuşlardır [124]. Ülkemizde yapılan bazı HPV çalışmaları ve kullanılan yöntemler Tablo 5.1’de gösterilmektedir. Tablodan da görüldüğü gibi PCR kullanılarak yapılan çalışmalarda HPV saptanma oranı ortalama %8.5 iken HC ile yapılan çalışmalarda ortalama %4 oranında saptanmıştır [99].

Tablo 5.1. Ülkemizde yapılan HPV çalışmaları

<b>Çalışmanın Yapıldığı Yer</b>	<b>n</b>	<b>Yöntem</b>	<b>%</b>
<b>Ege SSK Hastanesi, İzmir</b>	1353	HC 2	2.1
<b>Hacettepe Üniversitesi Hastanesi, Ankara</b>	1032	HC 2	4
<b>Erciyes Üniversitesi Hastanesi, Kayseri</b>	230	HC 1	6
<b>Toplam</b>	2615	<b>HC ortalaması</b>	4
<b>Numune Hastanesi, Ankara</b>	134	PCR	2.2
<b>Hacettepe Üniversitesi Hastanesi, Ankara</b>	60	PCR	3.3
<b>Başkent Üniversitesi Hastanesi, Ankara</b>	403	PCR	20
<b>Toplam</b>	597	<b>PCR ortalaması</b>	8.5

HC 2 ve konsensus Real-Time PCR yöntemlerinin ikisi ile de pozitif saptanmış olan 32 örneğin, HC 2 ile saptanan risk grubu dağılımlarında; 22 (%68.8) örneğin yüksek riskli grupta, 9 (%28.1) örneğin düşük riskli grupta, 1 (%3.1) örneğin de hem yüksek hem düşük riskli grupta olduğu belirlenmiştir. Aynı örneklerin pyrosequencing ile yapılan genotip tayinlerinde 32 örnekten 30 (%93.8)'unda genotip belirlenirken, 2 (%6.2) örnekte ise tiplendirme yapılamamıştır. Diğer taraftan HC 2 testi ile negatif saptanmış olan 21 örnek ise konsensus Real-Time PCR yönteminde pozitif saptanmış; pyrosequencing ile bunların 14 (%66.7)'ü tiplendirilmiş, 7 (%33.3)'sinde tip belirlenememiştir.

Tiplendirmesi yapılamayan toplam 9 örneğin 2'si HC 2 yönteminde biri yüksek riskli HPV, diğeri düşük riskli HPV ile pozitif olarak saptanmışken; diğer 7 örnek HC 2 ile negatif olarak saptanmıştır. Pyrosequencing'de tiplendirme yapılamamasının nedeni olarak; örnekteki HPV miktarının pyrosequencing'in saptama limitinin altında olabileceği veya koenfeksiyonlar olarak düşünülmüştür. Pyrosequencing'in saptama limitini test etmek için aynı örneğin farklı miktarlarında çalışılması denenebilir.

HC 2 testi ile yüksek riskli grupta saptanan toplam 22 örneğin pyrosequencing ile yapılan genotiplendirmesinde 16'sı yüksek riskli grupta olan

genotiplerle, 2'si muhtemel yüksek riskli grupta olan genotiplerle, 3'ü birden fazla genotiple (3'ü de yüksek riskli tip içeriyor) tiplendirilirken, 1'inde tip belirlenememiştir.

HC 2 yönteminde, düşük riskli grupta saptanan 3 örnek ve yüksek riskli grupta saptanan 2 örnek pyrosequencing ile muhtemel yüksek riskli genotip olarak belirlenirken; HC 2 ile düşük riskli grupta saptanan bir örnek ise pyrosequencing ile yüksek riskli genotip olarak tiplendirilmiştir. Bir örnekte ise HC 2 ile hem yüksek risk hem düşük riskli HPV pozitif bulunmuş, pyrosequencing'de ise sadece yüksek riskli genotiple tiplendirme yapılmıştır. Bu farklılıkların nedeni ise gelişebilecek çapraz reaksiyonlar veya HC 2'nin muhtemel yüksek riskli tipleri belirleyememesi olabilir.

HC 2 yöntemi ile negatif olarak saptanmış olup konsensus Real-Time PCR ile pozitif olarak belirlenmiş olan 21 örnekten 2'si yüksek riskli genotip, 7'si muhtemel yüksek riskli genotip, 1'i birden fazla genotiple, 4'ü düşük riskli genotiple tiplendirilmiş olup 7 örnekte tiplendirme yapılamamıştır. HC 2 ile negatif saptanan 7 muhtemel yüksek riskli genotip HC 2'nin saptadığı tipler arasında değildir. Bunların dışındaki 14 genotipin HC 2 ile saptanamaması iki yöntemin duyarlılıkları arasındaki farktan kaynaklanıyor olabilir. Yine konsensus Real-Time PCR ile pozitif saptanıp pyrosequencing ile tiplendirilemeyen 7 örnekte de tiplendirme için gereken DNA miktarı yeterli olmadığından tiplendirme yapılamamış olabilir.

Yapılan farklı çalışmalarda HPV prevalansları ve genotip tayinleri belirlenmeye çalışılmış ve en çok saptanan genotipler 16, 18 olarak belirlenmiştir. Yapılan bir meta analiz çalışmasında, sitolojisi normal olan kadınlarda, 48 çalışmanın tip spesifik prevalans verilerine göre en yaygın beş HPV tipi; HPV 16 (%2.5), HPV 18 (%0.9), HPV 31 (%0.7), HPV 58 (%0.6) ve HPV 52 (%0.6) olarak saptanmıştır [37]. Avrupa ülkelerinde toplam 18 çalışmanın verileri ile yapılan meta analizde 30-64 yaş arası kadınlarda bütün yüksek risk HPV pozitifler arasında HPV 16'nın ortalama oranının yaklaşık %30 ve HPV 18'in ise %12 oranında olduğu bildirilmiştir [87]. Kulmala ve arkadaşları Rusya, Belarus ve Litvanya'da 2007 yılında 15-85 yaş arası kadınlarda HPV tespiti için HC 2, genotiplendirme için real time PCR testini kullanarak yaptıkları çalışmada, en yaygın tip olarak %34.3 ile HPV 16'yı, ikinci yaygın tip olarak ise %14.3 ile HPV 31'i bildirmişlerdir [92].

İnal ve arkadaşlarının HC 2 testini kullanarak yaptıkları ve servikal intraepitelyal lezyon ile HPV ilişkisinin araştırıldığı, 1353 kadını içeren çalışmada pozitif bulunan örneklerin %24.1'inde HPV 6, %27.5'inde HPV 11, %27.5'inde HPV 16, %10.3'ünde HPV 18 ve %10.3'ünde HPV 31 tespit etmişlerdir [98]. Özalp ve arkadaşları 2011 yılında Eskişehir'de yaptıkları çalışmada 615 poliklinik hastasının 26 (%4.2)'sında HPV pozitifliği saptamışlar; en yaygın tipler olarak HPV tip 16 (12 hastada), HPV tip 18 (3 hasta), HPV tip 51 (3 hasta)'i belirlemişlerdir [100].

Araştırmamızda pyrosequencing ile yaptığımız genotip tayininde, Eskişehir Bölgesinde, HPV tip 16 en çok karşılaşılan tip olmuştur. Kadınların 12 (%7.9 152 kadındaki oran)'sında tip 16 tek başına saptanırken; 3 (%2.0) örnekte bir başka tipler birlikte (tip 16+tip 33, tip 16+tip 70 ve tip16+tip 90) saptanmıştır. Toplamda saptanan tip 16 sayısı 15 (%9.9) olup tiplendirilebilen örnekler içindeki oranı %34.1 olarak belirlenmiştir. Tip 16'yı, 11 (%25.0) örnekle HPV tip 90 ve 4 (%9.1) örnekle HPV tip 18 takip etmektedir. Bizim araştırmamızda en çok görülen tiplerden HPV tip 16 ve HPV tip 18 literatürlerdeki birçok çalışmada da en çok saptanan tipler arasındadır. Bununla birlikte bizim çalışmamızda ikinci en sık tip olarak HPV tip 90 belirlenmiştir. HPV tip 90'daki bu yüksek oran tipler arasında çapraz reaksiyon olabileceğini akla getirmektedir.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

HPV enfeksiyonu, cinsel temasla bulaşan hastalıklar içerisinde en sık görülen enfeksiyon olup serviksin skuamöz hücreli kanserlerinin %99'unda HPV DNA tanımlanmıştır. Serviks kanseri ile HPV ilişkisi kanser ile etken ilişkileri içerisinde en yükseğidir.

Servikal kanser, bütün dünyada, kadınlarda meme kanserinden sonra görülen ikinci en yaygın kanserdir. Servikal kanser, prekanseröz lezyonların tespiti ve tedavisi ile büyük oranda önlenbilir bir hastalıktır. Servikal kanser vakalarının %75-80'i servikal kanser tarama programlarının etkili bir şekilde yapılmadığı veya uygulanamadığı gelişmekte olan ülkelerde görülür.

Servikal kanser prevalansı Pap smear tekniğinin kullanıldığı tarama stratejileriyle belli seviyelere kadar indirilmiş ancak istenilen düzeye çekilememiştir. FDA 30 yaş ve üstündeki kadınlarda yapılan kanser taramalarında yüksek riskli HPV DNA testinin Pap smear ile birlikte eş zamanlı kullanımını desteklemektedir. Günümüzde servikal kanser taramasında, yüksek riskli HPV'nin saptanmasında HC 2 (QIAGEN, Hilden, Almanya), Cervista test (Hologic, Madison, WI, ABD) ve Roche Cobas 4800 HPV testi (Roche, Branchburg, NJ, ABD) olmak üzere üç yöntem FDA tarafından onaylanmıştır. Servikal kanser tarama testlerinde anormal sitoloji tespit edilen hastaların mutlaka HPV DNA testi ile birlikte değerlendirilmesi hastalığın kesin tanısı, prognozu ve tedavisi hakkında yol göstermektedir. Bu yaklaşımla hastalara gereksiz invazif girişimler önlenmekte ve ülke ekonomisine önemli bir katkı sağlanmış olmaktadır.

Bu çalışmada, Eskişehir bölgesinde, 30-65 yaş arası kadınlarda HPV DNA varlığı araştırılmış ve var olan tiplerin sıklığı değerlendirilmiştir. Araştırmaya Eskişehir Yunus Emre Devlet Hastanesi bünyesinde faaliyet gösteren Kanser Erken Teşhis, Tarama Merkezi'ne (KETEM) tarama amaçlı başvuran, 30-65 yaş arası 1081 kadın dahil edilmiştir. Araştırmaya katılan tüm kadınların servikal örnekleri Pap smear ve Hybrid Capture 2 (HC 2) yöntemleri ile test edilmiş, daha sonra rastgele seçilen 152 kadının servikal örneği konsensus Real-Time PCR ile taranarak HPV DNA varlığı saptanan örneklerde pyrosequencing ile genotiplendirme yapılmıştır. Böylece HPV DNA varlığını saptamada bu iki moleküler yöntemin performansları



değerlendirilmiştir. Ayrıca her iki moleküler yöntemin sonuçları Pap smear test sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Araştırma sonucunda Pap testi ile pozitif saptanan bazı örneklerde HPV varlığı gösterilememiş, Pap testi ile negatif olarak raporlanan bazı örneklerde ise yüksek riskli HPV varlığı saptanmıştır. HPV enfeksiyonu ile servikal kanser arasındaki güçlü etiyolojik ilişki, ülkemizdeki sitopatolog sayısının yetersizliği, ekonomik maliyet ve kadınların yaşayacağı stres düşünüldüğünde, Amerika Kolposkopi ve Servikal Patoloji Cemiyeti (ASCCP) ve FDA'nın (Food and Drug Administration) da önerileri ile servikal kanser taramasında Pap teste ilave olarak moleküler bir testin kullanılmasının gerekliliği açıktır.

Araştırmada kullanılan iki moleküler yöntemin pozitiflik sayıları ve belirledikleri risk grubu dağılımları arasında da bazı farklılıklar saptanmıştır. Bu nedenle servikal kanser taramasında Pap smear testi ile birlikte kullanılacak en doğru moleküler yöntemin hangisi olacağının belirlenmesi için testlerin uyumluluklarının da değerlendirildiği çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Servikal kanser taraması kadar önemli bir başka konu ise HPV enfeksiyonundan korunmaktır. Bu konuda yapılabilecek doğal uygulamalar; cinsel ilişki yaşının mümkün olduğu kadar geciktirilmesi ve menarş yaşından uzaklaştırılması, sigara içilmemesi, partner sayısının az olması gibi yöntemlerdir. Fakat HPV, bulaşıcılığı çok yüksek olan bir virustur ki; bütün bu korunma önlemleri yanında rutin jinekolojik muayeneler ve özellikle aşı uygulamaları da korunmada çok önemlidir.

Biz araştırmamızda Eskişehir Bölgesi'nde yaşayan kadınlarda en sık saptanan yüksek riskli iki HPV tipini; HPV tip 16 ve HPV tip 18 olarak belirledik. Bu veriler mevcut aşuların bölgemiz kadınlarında HPV enfeksiyonundan korunmada uygun bir seçenek olacağını düşündürmektedir.

Sonuç olarak toplumdaki tüm bireyler HPV enfeksiyonu, sonuçları ve korunma yöntemleri konusunda bilinçlendirilmeli, aşı ve servikal kanser taraması uygun popülasyonlara önerilen programlar doğrultusunda en etkin şekilde yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Papilloma ve polyomavirüsler. Bölüm 6 İç: Tıbbi Mikrobiyoloji 6. Baskı, Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Eds. Başustaoğlu AC. Çeviri ed. Atlas Kitapçılık Ankara, 2010: s 499-507.
2. Keen EF, Aldous WK. Genital infections and sexually transmitted diseases. Chapter 38 In: Textbook of Diagnostic Microbiology 4th ed, Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. eds. Saunders Elsevier Missouri, 2011: s 901-926.
3. Diagnosis of Infections Caused by Viruses, Chlamydia, Rickettsia, and Related Organisms. Chapter 23 In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6. edit. Winn WJr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. eds. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia. 2006: s 1327-1419.
4. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses Fields Virology. İç: Papillomaviruses, Knipe DM, Howley PM eds. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia. 2007: s 2231-2264.
5. Ergünay K editör. İnsan papillomavirüsleri. Kısım 2, Bölüm 20 İç: Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, Ergünay K, Us AD. Eds. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara, 2011: s 591-605.
6. Wong AA, Fuller J, Pabbaraju K, Wong S, Zahariadis G. Comparison of the Hybrid Capture 2 and cobas 4800 Tests for detection of High-Risk Human Papillomavirus in Specimens Collected in PreservCyt Medium. Journal of Clinical Microbiology. 2011; 50(1): 25-29.
7. Köse MF, Turan T, Naki MM. Human papillomavirüs ile ilişkili hastalıklar. Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi. 2012; 17(1): 22-33.
8. Badur S. Human papillomavirüs: virolojik ve immünolojik özellikleri. Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi. 2012; 17(1): 1-8.
9. Yarkın F, Vardar MA. HPV immunolojisi ve natürel enfeksiyonlar. Türkiye Klinikleri Journal of Gynecology Obstetrics-Special Topics 2009; 2(1): 43-47.

10. Qiao Y, Sellors JW, Eder PS, et al. A new HPV-DNA test for cervical-cancer screening in developing regions: a cross-sectional study of clinical accuracy in rural China. *The Lancet Oncology*. 2008; 9(10): 929-936.
11. Barbieri D, Nocera M, Gallinella G, Gentilomi GA, Plazzi M, Costa S, Santini D, Venturoli S. Comparison of HPV sign genotyping test with INNO-LiPA HPV genotyping extra assay on histologic and cytologic cervical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 74(1): 43-8.
12. Wright TC, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *The New England Journal of Medicine*. 2003; 348(6): 489-490.
13. L ning M, Gissmann L, Diedrich K, et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *Dtsch Arztebl*. 2007; 104(41): 2806-2810.
14. zur Hausen H. Papillomaviruses to vaccination and beyond. *Biochemistry (Moscow)*. 2008; 73(5): 498-503.
15. Lowy DR. History of Papillomavirus Research. Chapter 2 In: *The Papillomaviruses*, Garcea RL, DiMaio D eds. Springer Science Business Media, LLC, 2007; s: 13-28.
16. Zur Hausen H. Historical Review. Chapter 1 In: *Infections Causing Human Cancer*. Wiley-VCH. Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim, 2006.
17. M, Gissmann L, Ikenberg H, et al. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 3812-3815.
18. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The Embo Journal*. 1984; 3(5): 1151-1157.
19. Roden RB, Ling M, Wu TC. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Human Pathology*. 2004; 35(8): 971-982.
20. Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009; 384: 260-265.

21. Koç FU, Kurugöl Z. Human papillomavirüs epidemiyolojisi. *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*. 2012; 17(1): 9-12.
22. Arman D, Özdemir K. Human papillomavirüs aşıları. *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*. 2012; 17(1): 18-21.
23. Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspectives on Sexual Reproductive Health* 2004; 36(1): 6-10.
24. Ağaçfıdan A. Human Papillomavirus infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve ülkemizdeki durumu. 3.Ulusal Viroloji Kongresi Uludağ. 2007; s 111-116.
25. Scheurer ME, Tortolero G, Adler K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2005; 15(5): 727-746.
26. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL et al. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women's Health Study. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002; 186: 462-469.
27. Yarkın F. Human Papillomavirus: Patogenez, epidemiyoloji ve tanı. 2.Ulusal Viroloji Kongresi Antalya. 2005; s 20-31.
28. Bakır M. Human Papillomavirüs yükü ve farmakoekonomi. *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*. 2012; 17(1): s 13-17.
29. Patterson BK. İnsan Papillomavirüsleri. Kısım 6 Bölüm 106. İç: *Klinik Mikrobiyoloji 9th ed*, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA eds, Başustaoğlu A (çevr ed). Atlas Kitapçılık, Ankara; 2009: s.1601-1611.
30. Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2002; 16: s 231-240.
31. Tuncer S, Ustaçelebi Ş. (ed). İnsan Papillomavirüsleri. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1.Baskı. Güneş Kitabevi, Ankara; 1999. s.797-802.
32. Villiers EM, Claude F, Thomas R. Broker, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324: s 17- 27.

33. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*. 2006; 118: s 1071-1076.
34. Castellsague X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 2008; 100: s 4-7.
35. Munoz N, Bosch FX, de San Jose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. The New England Journal of Medicine*. 2003; 348: 518-27.
36. Bernard H U. The clinical importance of nomenclature, evolution and taxonomy of Human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 32: 1-6.
37. 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. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007; 7(7): 453-459.
38. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science (London)*, 2006; 110(5): 525-541.
39. Tuncer ZS. Jinekolojik açıdan human papilloma virus infeksiyonu Hacettepe Tıp Dergisi. 2007; 38: 8-14.
40. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 32: 7-15.
41. Schlecht FN, Platt RW, Duarte-Franco E, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003; 95: 1336-1343.
42. Patterson NA, Smith J. L. and Ozbun MA. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *Journal of Virology*. 2005; 79: 6838-6847.

43. Christy M, Laimonis A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology*. 2006; 16(2): 83-97.
44. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000; 181(6): 1911-1919.
45. Schiller JT, Davies P. Science and society: Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nature Review Microbiology*. 2004; 2: 343-347.
46. Sheu BC, Chang WC, Lin HH, et al. Immune concept of human papillomaviruses and related antigens in local cancer milieu of human cervical neoplasia. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2007; 33(2): 103-113.
47. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, et al. Quadrivalent vaccine against human papillomaviruses to prevent anogenital diseases. *The New England Journal of Medicine*. 2007; 356: 1928-1943.
48. Gunter J. Genital and perianal warts: new treatment opportunities for human papillomavirus infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2003; 189(3): 3-11.
49. Monk BJ, Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. *Gynecologic Oncology*. 2007; 107(2): 6-13.
50. Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, et al. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nature Genetics*. 2002; 32(4): 579-581.
51. Helen Trottier, Ann N. Burchell. Epidemiology of Mucosal Human Papillomavirus Infection and associated Disease. *Public Health Genomics*. 2009; 12: 291-307.
52. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2007; 57: 43-66.

53. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM; ALTS Group. A 2- year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007; 195(11): 1582-1589.
54. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006; 24(1): 1-15.
55. Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *Journal of the National Cancer Institute*, 2008; 100(7): 513-517.
56. Bosch X Harper D. Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecologic Oncology*, 2006; 103(1): 21-24.
57. Jamieson DJ, Paramsothy P, et al. Vulvar, vaginal, and perianal intraepithelial neoplasia in women with or at risk for human immunodeficiency virus. *Obstetric Gynecology*, 2006; 107(5): 1023-1028.
58. Uronis HE, Bendell JC. Anal cancer: an overview. *The Oncologist*, 2007; 12(5): 524-534.
59. Begum S, Cao D, Gillison M, et al. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2005; 11: 5694-5699.
60. Ağa fıdan A. Cinsel Yolla Bulaşan Viral İnfeksiyonlar. Bölüm 17 İç: Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. eds. Ankara: Güneş Kitabevi; 2004. s.285-292.
61. Dim CC. Towards improving cervical cancer screening in Nigeria: A review of the basics of cervical neoplasm and cytology. *Nigerian Journal of Clinical Practice*. 2012; 15(3): 247-252.
62. van Hamont D, Bekkers RLM, Massuger LFAG, Melchers WJG. Detection, management, and follow-up of pre-malignant cervical lesions and the role for human papillomavirus. *Reviews in Medical Virology*, 2008; 18(2): 117-132.

63. Krane JF, Granter SR, Trask CE, Hogan CL, Lee KR. Papanicolaou smear sensitivity for the detection of adenocarcinoma of the cervix: a study of 49 cases. *Cancer*, 2001; 93(1): 8-15.
64. Stoler MH. Testing for human papillomavirus: data driven implications for cervical neoplasia management. *Clinical Laboratory Medicine*, 2003; 23(3): 569-583.
65. Bhatla N, Dar L, Sankaranarayanan R, Kumar P, Patro AR, Pati S, et al. Age-specific human papillomavirus prevalence in north India. 24th International Papillomavirus Conference, Beijing, China; 2007; 8-42.
66. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG, et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 2003; 95(1): 46-52.
67. <http://www.asccp.org/edu/practice/cervix.shtml> (12.06.2012).
68. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000; 92(5): 397-402.
69. Thomas CJ. Human papillomavirus testing in primary cervical screening and abnormal Papanicolaou management. *Obstetrical Gynecological Survey*, 2006; 61(6): 15-25.
70. Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Verheijen RH. HPV testing in cervical screening. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2006; 20(2): 253-266.
71. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Fırat P, Tuncer S. Z, Tuncer S, Yıldız I, Ustaçelebi Ş. Sitolojik Atipi İzlenen Servikal Örneklerde İnsan Papilloma Virusunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Hibridizasyon Yöntemleriyle Saptanması ve Tiplendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2008; 42: 273-282.



72. Hubbard RA Human papillomavirus testing methods. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2003; 127(8): 940-945.
73. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*, 2005; 32(1): 43-51.
74. Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 2006; 98: 765-774.
75. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *The International Journal of Biological Markers*, 2009; 24(4): 215-22.
76. van Doorn LJ, Kleter B, Quint WG. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2001; 1(4): 394-402.
77. van Doorn LJ, Quint WG, Kleter B, et al. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMY line blot assay and the SPF(10) line probe assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40(3): 979-983.
78. Jiang HL, Zhu HH, Zhou LF, Chen F, Chen Z. Genotyping of human papillomavirus in cervical lesions by L1 consensus PCR and the Luminex xMAP system. *Journal of Medical Microbiology*, 2006. 55(6): 715-720.
79. Lie AK, Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R, Onsrud M, Thoresen S. DNA versus RNA based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecologic Oncology*, 2005; 97(3): 908-915.
80. Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *British Journal of Cancer*, 2005; 92(12): 2195-2200.

81. Stillman MJ, Day SP, Schutzbank TE. A comparative review of laboratory-developed tests utilizing Invader HPV analyte-specific reagents for the detection of high-risk human papillomavirus. *Journal of Clinical Virology*, 2009; 45(1): 73-77.
82. Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *American Cancer Society*, 2007; 111(1): 1-14.
83. Molden T, Nygard JF, Kraus I, et al. Predicting CIN2 when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR: a 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *International Journal of Cancer*, 2005; 114: 973-976.
84. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. İnsan papillomavirusları. Bölüm 132. İç: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M eds. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2008: s 1700-1710.
85. Yüce K. HPV enfeksiyonu geçiş yolları ve korunma. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik-Özel Sayı*, 2009; 2(1): 82-85.
86. Ardıç N, Öztürk O, Ergünay K, Sezer O. Servikal sürüntü örneklerinde yüksek riskli insan papilloma virus tiplerine ait E6/E7 mRNA'larının ticari otomatiza bir NASBA sistemiyle araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2009; 43: 463-469.
87. De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S. HPV infection in Europe. *European Journal of Cancer*. 2009; 45(15): 2632-2639.
88. Leinonen M, Talonen LK, Anttila A, Dyba T, Tarkkanen J, Nieminen P. Prevalence of oncogenic human papillomavirus infection in an organised screening population in Finland. *International Journal of Cancer*, 2008; 123(6): 1344-1349.
89. Kroupis C, Thomopoulou G, Papatomas TG, Vourlidis N, Lazaris AC. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Athens, Greece. *Epidemiology and Infection*. 2007; 135(6): 943-950.

90. Bao YP, li N, Smith JS, Qiao YL; ACCPAB members. Human papillomavirus type distribution in women from Asia: a meta-analysis. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2008; 18(1): 71-79.
91. Ghaffari SR, Sabokhar T, Mollahajian H, Dastan J, Ramezanzadeh F, Ensani F, Yarandi F, Mousavi-Jarrahi A, Mohageghi MA, Moradi A. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women with normal and abnormal cervical cytology in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2006; 7(4): 529-532.
92. Kulmala SM, Shabalova IP, Petrovitchev N, Syrjanen KJ, Gyllensten UB, Syrjanen SM, NIS and S. Group. Prevalence of the most common high-risk HPV genotypes among women in three new independent states of the former Soviet Union. *Journal of Medical Virology*. 2007; 79(6): 771-781.
93. Sanchez-Anguiano LF, Esquivel CA, Romero MAR, Rodríguez MC. Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes. *BMC Infectious Diseases*, 2006; 6: 27.
94. Vardar MA, Altıntaş A, Doran F, Arıdoğan N, Demir C, Burgut R. et al. Human papillomavirus detection in cervical smears and cervical tissue excised by the Loop Electrosurgical Excision Procedure (LEEP). Diagnostic value of cytology, colposcopy and histology. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 1995; 16(6): 494-499.
95. Altuglu I, Terek MC, Özaçar T, Özşaran AA, Bilgiç A. The prevalence of human papilloma virus DNA in women with mucopurulent endocervicitis. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2002; 23(2): 166-168.
96. Ozşaran AA, Dikmen Y, Akercan F, Zekioğlu O, Terek MC. The triage of squamous cell abnormalities of cervical cytology by human papilloma virus screening. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2003; 24(6): 535-538.
97. Ozcelik 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. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2003; 24(2): 157-159.

98. Inal MM, Köse Ş, Yıldırım Y, Özdemir Y, Töz E, Ertopçu K, et al. The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women. *International Journal of Gynaecological Cancer*. 2007; 17(6): 1266-1270.
99. Dursun P, Senger S, Arslan H, et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infectious Diseases* 2009; 9: 191
- 100.Özalp S, Us T, Arslan E, Öge T, Kaşifoğlu N. HPV DNA and Pap smear test results in cases with and without cervical pathology. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*, 2012; 13(1): 8-14.
- 101.Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors-occurrence properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 2012; 113: 1014-1026.
- 102.O'Keefe EJ,Gardner A, Currie MJ, Garland S, Tabrizi S, Bowden FJ. Prevalence of genital human papillomavirus DNA in a sample of senior school-aged women in the Australian Capital Territory. *Sex Health*, 2006; 3(2): 91-94.
- 103.de Sanjose S, Almirall R, Lloveras B, Font R, Diaz M, Munoz N, Catala I, Meijer JLM, Snijders Peter JF, Herrero R, Bosch FX. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Diseases*, 2003; 30(10): p. 788-793.
- 104.JNI Vet, et al. Prevalence of human papillomavirus in Indonesia: a population-based study in three regions. *Br J Cancer*, 2008; 99(1): 214-8.
- 105.Baay M, Verhoeven V, Wouters Kristien, Lardon F, van Damme P, Avonts D, van Marck E, van Royen P, Vermorcken JB. The prevalence of the human papillomavirus in cervix and vagina in low-risk and high-risk populations. *Scand J Infect Dis*, 2004; 36(6-7): 456-9.
- 106.Volkov VG, Zacharova TV, Koroleva LN. Human papillomavirus 16/18 types among young women from tula (Russia). *J Low Genit Tract Dis*, 2003; 7(1): 3-5.

107. Matos E, Loria D, Amestoy GM, Herrera L, Prince MA, Moreno J et al. Prevalence of Human Papillomavirus Infection Among Women in Concordia, Argentina: A Population -Based Study. *Sexually Transmitted Diseases*. 2003; 30 (8): 593-599.
108. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*, 2005; 191(11): 1808-16.
109. Nyari T, Cseh I, Woodward M, et al. Screening for human papillomavirus infection in asymptomatic women in Hungary. *Human reproduction*. 2001; 16(10): 2235-7.
110. Tuncer ZS, Başaran M, Ustaçelebi Ş, Mocan G. High-risk Human Papilloma Virus (HPV) Infection determined by Hybrid Capture II assay in Turkish university hospital outpatient clinic. *Gynecol Obstet. Reprod Med* 2006; 12: 129-134.
111. Pereira CR, Rosa ML, Vasconcelos GA, Faria PC, Cavalcanti SM, Oliveira LH. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio DE Janeiro, Brazil. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17(3): 651-60.
112. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer*, 2006; 119(11): 2677-84.
113. Sapy T, Poka R, Szarka K. Age-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in a Hungarian female population with positive cytology. *Eur J Obstet Gynecol Reproductive Biology*, 2008; 138(2): 194-8.
114. Lindau ST, Melinda LD, Gaumer E, Surawska H, Jordan JA. Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus Among Older Women. *Obstet Gynecol* 2008; 112(5): 979-89.
115. Smith EM, Ritchie J.M, Levy BT, et al. Prevalence and persistence of human papillomavirus in postmenopausal age women. *Cancer Detect Prev*, 2003; 27(6): 472-80.

116. Smith EM, Johnson SR, Feddersena D, et al. Persistent HPV infection in postmenopausal age women. *Int J Gynaecol Obstet*, 2004; 87(2): 131-7.
117. Smith JS, Melendy A, Rashida KR, et al. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. *J Adolescent Health*, 2008; 43(4): 5-25.
118. de Villiers EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 103: 705-708.
119. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92(6): 464-74.
120. Harper DM, Longacre MR, Noll WW, Belloni DR, Cole BF. Factors Affecting the detection rate of Human Papillomavirus 221-227. *Ann Fam Med*. 2003; 1(4): 221-7.
121. Centurioni M G, Puppo A, Merlo DF, Pasciucco G, Cusimano ER, Siritto R, Gustavino CA. Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population. *BMC Infect Dis*, 2005; 5: 77.
122. Descriptive Diagnoses Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. In: *The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses*, Kurman RJ, Solomon D eds. Springer-Verlag, New Yourk. 1994: s 9-81
123. Kulmala SM, et al., Human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(6): 2470-5.
124. Klug SJ, Hukelmann M, Hollwitz B, Düzenli N, Schopp B, et al., Prevalence of human papillomavirus types in women screened by cytology in Germany. *Journal of Medical Virology*, 2007; 79: 616-625.

