MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

JİNEKOLOJİ HASTALARINDA HPV DNA SONUÇLARI İLE SERUM HPV IGG ANTİKOR DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Gülsüm EKİM

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Kenan DEĞERLİ

Manisa, 2025

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince ve tezimle ilgili çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Kenan DEĞERLİ'ye, tez konusunun seçilmesinde, hazırlanmasında ve bütün eğitim sürecinde bana yol gösteren, ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Sinem AKÇALI'ya,

Yine uzmanlık eğitimim süresince bilgi, beceri ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU'na, Prof. Dr. Hörü GAZİ'ye, Prof. Dr. Semra KURUTEPE'ye, Prof. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK'e ve Prof. Dr. Talat ECEMİŞ'e,

Örnek toplama sürecindeki destekleri ve ilgisi için Kadın Hastalıkları ve Doğum AD'dan Prof. Dr. Aslı Göker'e,

Asistanlığım süresince keyifli ve huzurlu bir çalışma ortamını paylaştığımız değerli asistan arkadaşlarıma, biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemi sağlayan başta annem ve babam olmak üzere, ilgi, destek ve sevgileri ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Dr. Emrah EKİM' ve hayatımın anlamı çocuklarım; Betül Elif, Mustafa Selim ve Ali Kerem'e sonsuz teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Gülsüm EKİM

Manisa 2025

İÇİNDEKİLER

Sayfa

GİRİŞ ……. 1

GENEL BİLGİLER……..……. 4

2.1- HUMAN PAPİLLOMAVİRUS (HPV)

2.1.1- HPV Tarihçe……..……. 4

2.1.2- HPV Epidemiyoloji ……. 6

2.1.3- HPV Bulaş yolları ……. 8

2.1.4- HPV Yapısı ve Proteinleri ……..……..…. 10

2.1.5- HPV Sınıflandırma ……..……..... 18

2.1.6- HPV Patogenez ve İmmunite ……..……..... 21

2.1.7- HPV İlişkili Hastalıklar ……...……..…….. 28

2.1.7.1- Deri Siğilleri ……..…….. 28

2.1.7.2- Mukozal Siğiller ……..……. 30

2.1.7.2.1- Anogenital Siğiller ……..... 31

2.1.7.2.2- Vulvo-vaginal Siğiller ……..……. 31

2.1.7.2.3- Perianal Siğiller ……..…….. 32

2.1.7.2.4- Penil Siğiller ……..…... 33

2.1.7.2.5- Rekürren Respiratuvar Papillomatozis ……... 33

2.1.7.3- HPV ile ilişkili İnsan Kanserleri ……..... 34

2.1.7.3.1- Serviks Kanseri ……... 34

2.1.7.3.2- Anal Kanser ……..…… 36

2.1.7.3.3- Vaginal, Vulvar ve Penis Kanserleri …..…..… 37

2.1.7.3.4- Baş Boyun Kanserleri …….…. 38

2.1.8- HPV Tanı Yöntemleri …….……... 38

2.1.8.1- Klinik Muayene ……..…… 39

2.1.8.2- Patolojik Tanı …… 40

2.1.8.3- Mikrobiyolojik Tanı …….……... 41

2.1.8.4- Moleküler Yöntemler ……..…….. 42

2.1.8.4.1- Direkt hibridizasyon yöntemleri ……...….. 42

2.1.8.4.2- Sinyal amplifikasyon yöntemleri …….….. 44

2.1.8.4.3- Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri …….. 45

2.1.8.5- Serolojik Testler …….… 48

2.1.9- HPV Korunma ve Aşılama ……..…. 50

III. GEREÇ VE YÖNTEM ……..…….. 54

3.1- Örneklerin Toplanması …….…..... 54

3.2- Örneklerin Saklanması ……..……... 54

3.3- Anti HPV IgG antikorlarının tespiti ……...…… 55

3.4- DNA izolasyonu ve amplifikasyonu ……..……..... 57

3.5- Sonuçların değerlendirilmesi …… ……..... 59

3.6- Verilerin analizi…….…..…….... 60

IV. BULGULAR ……..…. 61

V. TARTIŞMA ……..… 69

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER ……..... 80

VII. ÖZET ……..... 82

VIII. İNGİLİZCE ÖZET …….…….. 84

IX. EKLER ……..... 86

EK-1.Smear uygulaması için aydınlatılmış bilgilendirme ve onam formu

XI. KAYNAKLAR ……..…. 91

SİMGELER VE KISALTMALAR

HR- HPV: Yüksek riskli Human papilloma virus

LR-HPV: Düşük riskli Human papilloma virus

ASC-US: Önemi saptanamayan atipik skuamöz hücreler

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ER: Östrojen Reseptörü

ORF: Açık Okuma Bölgesi

LCR: Long control region

URR: Upstream Regulatory Region,

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

CRPV: Cottontail Rabbit Papillomavirus

CSF: Colony Stimulating Factor

CIN: Cervical İntraepithelial Neoplasia

BPV: Bovine Papillomavirus (Sığır Papillomavirüsü)

KA: kondiloma Akuminatum

PAP: Papanicolaou

NK: Natural Killer (Doğal Öldürücü)

PRb: Retinoblastom Proteini

PCR: Polymerase Chain Reaction

LSIL: Low-Grade Squamous İntraepithe

ISH: In-situ Hibridizasyon

SBH: Southern Blot Hibridizasyon

VLP: Virus like particle

Ml: Mikrolitre

PAFR: Platelet Activating Factor Receptor

RRP: Rekürren Respiratuvar Papillomatozis

HSIL: High-Grade Squamous İntraepithelial Lesion

HSPG: Heparan Sülfat Proteoglikan

ER: Early Region (erken bölge)

LR: Late Region (geç bölge)

KGFR: Keratinosit Büyüme Faktör Reseptör

FDA: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)

OPC: Orofaringeal Kanser

EHD: Epitel Hücre Displazisi

OPSCC: Orofaringeal Skuamöz Hücreli Karsinom

CYBH: Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar

ASCH: Yüksek Dereceli Lezyon Dışlanamayan Atipik Skuamöz Hücreler

BLT: Buschke-Lowenstein Tümörü

HS: Heparan Sülfat

SSCC: Servikal Skuamöz Hücreli Karsinom

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SBH: Southern Blot Hibridizasyon

DBH: Dot-Blot Hibridizasyon

FISH: Floresans In Situ Hibridizasyon

IF: Intermediate Filamentleri

MHC: Major Histocompatibility Complex

HLA: İnsan Lökosit Antijeni

ICTV: International Council on Taxonomy of Viruses

EV: Epidermodysplasia Verruciformis

AIN: Anal Intraepitelyal Neoplazi

TABLO DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1: Human papillomavirüs klasifikasyonu……..... 20

Tablo 2: Rotor-Gene Q MDx cihazında QIAscreen HPV PCR

Testi ile bir çalışma için plaka ve rotor kurulumu ..……..…… 59

Tablo 3: QIAscreen HPV PCR Testinde kullanılan boyalar …… 60

Tablo 4: Çalışmaya alınan hastaların yaş dağılımları ……..… 61

Tablo5: Çalışma grubunda HPV DNA dağılımı ……..... 62

Tablo 6: Yaş gruplarına göre HPV DNA pozitifliği ……..... 63

Tablo 7: Yaş gruplarına göre HPV IgG pozitifliği……..…. 63

Tablo 8: HPV IgG ve HPV DNA ilişkisi ……..…. 64

Tablo 9: Smear sonuçlarına göre HPV DNA pozitifliği……. 66

Tablo 10: HPV DNA ile Servikal EHD arasındaki ilişki ……..… 67

Tablo 11: Serum HPV IgG ile Servikal EHD ilişkisi……..…. 67

Tablo 12: Hastaların medeni durumlarına göre

HPV DNA pozitifliği 68

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Normal servikal sitolojili kadınlarda HPV prevalansı ……. 7

Şekil 2: HPV genetik yapısı ……... 12

Şekil 3: HPV filogenetik sınıflaması ……..... 19

Şekil 4: HPV'nin mikrotravma sonucu servikal bazal membrana ulaşması ……... 21

Şekil 5: HPV 16'nın hücre içine giriş mekanizması ……..……... 24

1.GİRİŞ

Human papillomavirüsler (İnsan papilloma virüsler, HPV) tek konakçısı insan olan Papillomaviridae ailesi içinde yer alan DNA virüslerinin geniş bir grubudur. HPV 50-55 nm çapında, ikozahedral kapsidli, zarfsız, çift sarmallı, dairesel bir genoma sahip DNA virüsleridir [1]. HPV ilk olarak Papovaviridae ailesi içinde gruplandırılmıştır; daha sonra bu aile Papillomaviridae ve Polyomaviridae olarak ikiye ayrılmıştır.

Papillomaviridae ailesinde 12 farklı cins yer almaktadır. Bunlar alfa, beta, gamma, mu ve nu cinsleri ile bunların dışında kalan tüm hayvan papilloma virüslerinin oluşturduğu yedi cinsi içermektedir[2]. Alfa papillomavirüs cinsi, en büyük grup olup, insanda en sık rastlanan patojen kutanöz ve mukozal lezyonlarla ilişkili HPV tiplerini kapsar.

Tüm HPV tipleri, deri ve mukozalardaki skuamöz epitelyal hücrelere tropizm gösterir. Genital bölge ve mukozalarda kondiloma akuminatum (KA) adı verilen siğil şeklinde lezyonlara yol açar ve bu toplumun yaklaşık %1'ini etkilemektedir. Human papillomavirüs dünyada en sık görülen cinsel yolla bulaşan hastalık (CYBH) etkeni olarak kabul edilir. HPV ile tüm dünyada 630 milyon kişinin enfekte olduğu ve her yıl yaklaşık 6,2 milyon yeni vakanın ortaya çıktığı bilinmektedir. HPV'nin tüm dünyadaki prevalansının %9-13 arasında olduğu tahmin edilmektedir[3].

HPV, dünyada kadınlardaki kansere bağlı ölüm nedenleri içinde dördüncü sırada görülen servikal kanserin primer etkenidir[4]. Serviks kanseri dünyada kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci en sık görülen kanserdir ve her yıl 470.000'den fazla yeni vaka tanımlanmaktadır. Dünya genelinde servikal kansere bağlı yıllık yaklaşık 274.000 ölüm bildirilmektedir.

Günümüze kadar tanımlanan HPV tiplerinin sayısı 200'ü aşmıştır ve bunların yaklaşık yarısı genital sistem epitelini etkilemektedir[5]. Genital HPV'ler klinik olarak serviks kanserine yol açma riskine göre üç kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar; kanser açısından düşük riskli HPV'ler (6, 11, 40, 42, 43,

44, 54, 55 ve 62), olası yüksek riskli HPV'ler (26,53 ve 66) ve yüksek riskli HPV'ler (16 başta olmak üzere 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82) olarak gruplandırılmaktadırlar[6,7].

Genel popülasyonda en yaygın olan yüksek riskli HPV tipleri 16 ve 18'dir ve servikal kanserlerin yaklaşık %70'inden bu iki tipin sorumlu olduğu bildirilmektedir[8]. HPV'nin en sık neden olduğu lezyon genital siğiller olmasına karşın ilişkili olduğu malignitelere karşı son yıllarda dünya genelinde giderek artan bir ilgi vardır. Düşük riskli HPV tipleri siğil ve kondilom gibi benign lezyonlara yol açarken, yüksek riskli tipler (hr-HPV) serviks, vajina, vulva, penis, anüs ve baş boyun dahil olmak üzere insanlarda çeşitli kanserlerin etyolojisinde suçlanmaktadır [9].

HPV infeksiyonlarının klinik belirtileri geniş bir spektruma sahiptir; infeksiyonlar çoğunlukla asemptomatik ve benign seyrederken, bazen tekrarlayıcı, tedaviye dirençli ve proliferatif lezyonlar şeklinde görülmektedir. Bu durum çoğunlukla, konakçının antiviral immün yanıtı ile ilişkilidir. Ayrıca virüsün tipi, lezyonun lokalizasyonu, bireyin immünolojik durumu ve epitelin doğası gibi faktörler değişken klinik tablo ile ilişkilidir [10].

Genç kadınlarda HPV enfeksiyonlarının yaklaşık %70'i birinci yılda, %90'ı ikinci yılda iyileşir. Ancak hastaların %5-10'unda enfeksiyon persiste olur ve bu durum invaziv servikal kansere ilerleyebilen prekanseröz lezyonlar açısından risk oluşturur. Bu süreç 10-15 yıl gibi uzun bir süredir ki; bu süre içerisinde prekanseröz lezyonlar tanı alabilir ve tedavi edilebilir.

Son yıllarda erkeklerde de anogenital bölge ve orofaringeal bölgenin benign ve malign lezyonlarında belirgin artış olduğu ve bu lezyonların HPV ile ilişkisinin giderek artmakta olduğu bildirilmektedir. HPV'nin her iki cinsiyette de sıklıkla anogenital bölgede yerleşim göstermesi ve latent enfeksiyonlar şeklinde seyretmesi özellikle cinsel aktif yaş grubunda enfeksiyonun çok hızlı bir şekilde yayılmasına neden olmaktadır [10,11].

HPV enfeksiyonlarında bulaş çoğunlukla cinsel ilişki ile olmaktadır. Perinatal bulaşma olasılığı nadir de olsa bildirilmektedir. Ayrıca immün sistemi

baskılanmış bireylerde bulaş riski de artmaktadır. Enfeksiyonlardan korunmada temel yol primer olarak enfeksiyonun geçirilmesiyle yada aşılama yoluyla oluşan salgısal immun yanıtın varlığıdır. Bunun yanısıra cinsel partner sayısının azaltılması, ilk cinsel aktivite yaşının geciktirilmesi, sünnet ve kondom kullanılması gibi bireysel korunma yöntemleri de enfeksiyonla mücadelede önem taşımaktadır. Hastalık temel olarak cinsel temas yoluyla bulaştığı için özellikle latent enfeksiyonların sıklıkla görüldüğü cinsel aktif dönemdeki kadınlarda HPV sıklığının ve toplumdaki hastalık seroprevalansının belirlenmesi ciddi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada herhangi bir şikayetle hastanemiz jinekoloji polikliniğine başvuran ve smear örneği alınarak HPV DNA test istemi yapılan 18-65 yaş arası kadın hastaların eş zamanlı serum örneklerinde HPV IgG antikor varlığının araştırılması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BiLGiLER

2.1.1-Tarihçe

HPV' lerin tarihçesi Antik Yunan ve Roma Çağlarına kadar dayanmaktadır. Bu çağlardan beri HPV'nin etken olduğu siğillerin varlığı ve bulaşıcı oldukları bilinmekle birlikte 19. yüzyılın başlarına kadar bu genital siğillerin, sifiliz veya gonorenin bir formu olduğu düşünülmekteydi. Papillomavirus tarihi temel olarak iki kısımda incelenebilir:

- 19. yüzyılın başlarına kadar yapılan hayvan deneyleriyle temel virolojik bilgilerin elde edilmesi
- 1970'li yıllardan itibaren insanlarda önemli bir hastalık etkeni olduğunun fark edilmesi

1842'de İtalyan fizikçi Domenico Rigoni-Stern, 1760-1839 tarihleri arasında Verona'da uterus kanserinden ölen kadınları incelemiştir. Uterus kanserinin bakire ve rahibelerde, evli veya dul kadınlara göre çok daha nadir olduğunu gözlemlemiş ve bunun HPV'ye bağlı olduğunu kanıtlamıştır. 1891'de Payne ve 1896'da Jadassohn kutanöz siğillerin enfeksiyöz kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir [12].

HPV bir konaktan diğerine deneysel olarak geçirilebilen ilk tümör virüsüdür. İnsanlardaki siğillerin viral etyolojisi ilk kez 1907 yılında Ciuffo tarafından açıklanmaya çalışılmıştır. Ciuffo ve 1924'te Serra hücresiz siğil ekstraktlarını başka canlılara inoküle etmişler ve bu bölgelerde kutanöz siğillerin oluştuğunu gözlemlemişlerdir [12,13].

Bu virüslere karşı 1930'larda ilgi artmış ve Shope 1933'te papillomavirusların retroviruslardan sonra malignensiye sebep olan ikinci virüs tipi olduğunu bildirmiştir. Shope ve Hurst vahşi kuzey Amerika pamuk kuyruklu tavşanlarda (cottontail) oluşan kutanöz papillomlarda papillomavirusu göstermişler ve hastalığın bulaşıcı olduğunu belirtmişlerdir. Etken sonradan cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) olarak adlandırılmıştır. Evcil cottontail tavşanlarda CRPV'un malign deri lezyonlarına sebep olduğu ilk kez Rus ve

Beard tarafından 1935 yılında gösterilmiştir. Böylece papillomavirus infeksiyonu ile kanser arasındaki ilişki ilk kez açıklanmıştır[14].

Strauss ve arkadaşları 1949 yılında insan siğillerinde elektron mikroskobunda ilk kez viral partikülleri tespit etmişlerdir. İto ve Evans 1961'de karsinomanın infeksiyöz papillomavirus DNA'sı içerdiğini göstermişlerdir.

Papillomavirüs araştırmalarındaki önemli gelişmelerden biri de 1963 yılında Crawford tarafından viral DNA'nın fiziksel özelliklerinin karakterize edilmesiyle olmuştur. 1970'lerde moleküler klonlama tekniklerinin kullanıma girmesiyle bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır. Servikal kanserlerde HPV'lerin varlığı deneysel olarak 1972 yılında araştırılmaya başlanmıştır. Bazı çalışmalarda genital lezyonların nadir olarak malign tümörlere dönüşüm gösterdiği bildirilmiştir.

İki çalışma grubu 1970'te aynı anda HPV familyasından bahsetmiş olup bu aileye üye olan yaklaşık 100 farklı tipin bulunduğunu iddia etmişlerdir. 1976'da Epidermodysplasia verruciformis (EV) ile ilişkili lezyonlara HPV'nin neden olduğu ispatlanmıştır [12]. HPV ile serviks kanseri arasındaki ilişki ise ilk kez 1976 yılında Zur Hausen tarafından bildirilmiştir. Gissmann ve zur Hausen 1980-1982 yılları arasında genital lezyonlardan ve laringeal papilloma örneklerinden iki farklı HPV DNA'sını karakterize etmişlerdir [14]. 1983'te Dürst ve ark. servikal kanser biyopsilerinden ve anogenital kanserlerin öncül lezyonlarından HPV 16 alt tipini izole etmişlerdir. 1984'te ise Boshart'ın yaptığı çalışmalarda servikal kanserden HPV 18 alt tipi izole edilmiştir[14]. 1985 yılında Schwarz ve arkadaşları tarafından E6 ve E7 proteinlerinin servikal kanserde selektif transkripsiyonunun gerçekleştiği bildirilmiştir[15]. Werness ve arkadaşları 1990'da p53 ile E6 proteinin etkileşimini, Dyson ve arkadaşları 1989'da pRb ile E7 proteini etkileşimini göstermişlerdir[12]. 1990'lı yılların başlarında Kirnbaurer ve ark. aşı çalışmalarında önem taşıyan VLP (virus-like particles)'yi in vitro elde etmenin tekniklerini geliştirmişlerdir[12]. Lambert ve arkadaşları 1993 yılında transjenik hayvanlarda tümör oluşumunu göstererek HPV'de onkojenik potansiyel olabileceği üzerinde durmuşlardır. HPV ile malign

konversiyon, Soto ve arkadaşları tarafından 2000 yılında net olarak tanımlanmıştır.

HPV aşıları 1996'da Zur Hausen ve 2006'da Lowy tarafından bildirilmiştir. Ayrıca Zur Hausen servikal kanser ile HPV arasındaki nedensel ilişkiyi gösteren çalışmasıyla 2008 yılında Nobel Tıp ödülünü almıştır [15]. Günümüze kadar yayınlanan birçok epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmalarından elde edilen bilgiler, serviks kanseri ve öncü lezyonlarının gelişiminde HPV infeksiyonunun en önemli basamaklardan biri olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca HPV servikal kanser dışında vulvar, vaginal, penil, perineal bölge, baş-boyun, oral bölge gibi diğer birçok solid organ maligniteleriyle de ilişkili ortaya konmuştur[15].

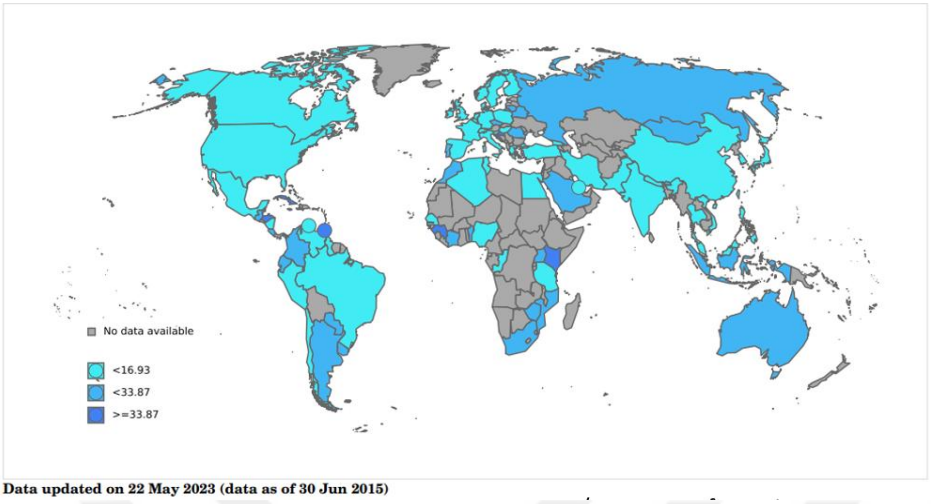
2.1.2- HPV Epidemiyoloji

Dünya genelinde en yaygın görülen cinsel yolla bulaşan hastalık etkeni HPV'dir. Her iki cinsiyette de cinsel yönden aktif yaş grubundaki bireylerin çoğu, hayatlarının bir döneminde en az bir kez HPV ile karşılaşmaktadır. HPV prevalansı popülasyona ve araştırmanın yapıldığı coğrafi bölgeye göre değişiklik göstermekle birlikte, asemptomatik kadınlarda HPV prevalansının %2-44 aralığında olduğu bildirilmektedir [16]. Başka bir çalışmada, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde HPV prevalansının %12,9 ile %86,0 arasında değiştiği ve toplam HPV prevalansının %49,1 olduğu belirtilmektedir[17].

Servikal sitolojisi normal 157.879 kadında yapılan bir meta-analizde, dünya genelinde kadın popülasyonda HPV prevalansının yaklaşık %10 olduğu ve 25 yaş altı kadınlarda bu oranın daha yüksek olduğu gösterilmiştir (%16,9) [18].

Afrika, özellikle doğu Afrika, en yüksek HPV prevalansına (%31,6), Güneydoğu Asya ise en düşük düzeltilmiş HPV prevalansına sahiptir (%6,2). Genel HPV prevalansının az gelişmiş dünya bölgelerinde %15,5, daha gelişmiş bölgelerde ise %10 olduğu tahmin edilmektedir [19].

Şekil 1: Normal servikal sitolojili kadınlarda HPV prevalansı



Erkeklerde dünya genelinde HPV prevalansı değerlendirildiğinde %1 ile %73 arasında oldukça değişken oranlar bildirilmektedir. Yakın zamanda yapılan bir meta-analitik çalışmaya göre, enfeksiyonun tüm erkek popülasyonunda rapor edilen prevalansı %49'dur ve kondilomlardan penil, anal ve orofaringeal karsinomlar gibi epitelyal tümörlere kadar değişen bir klinik spektruma sahiptir[20] . Erkeklerde HPV için risk faktörlerinin birçoğu hijyen ve korunma eksiklikleriyle ilişkilidir. Çeşitli çalışmalarda sünnetin HPV enfeksiyonuna karşı koruyucu bir faktör olduğu gösterilmiştir. Sünnetli erkeklerde HPV prevalansının sünnetsiz erkeklere göre daha düşük olduğu ve HPV temizlenme oranı ve hızının daha yüksek olduğu gösterilmiştir [20,21].

Ülkemizde HPV enfeksiyonları ile ilgili çalışmalar belirli hasta gruplarda ve sınırlı popülasyonlarda yapıldığından gerçek HPV prevalansını belirlemek zordur. 2019 verileri değerlendirildiğinde HPV tip 16 ve 18 prevalansının %4,2 ile %67,6 arasında değişmekte olduğu rapor edilmektedir[24]. Normal sitolojiye sahip kadınlarda HPV prevalansı %4,2 iken servikal intraepitelyal neoplazi 1'de (CIN 1) %24,1; CIN 2–3'de %30,2 ve servikal kanser'de %67,6 HPV pozitifliği bildiren çalışmalar vardır[22]. Asemptomatik kadınlarda HPV prevalansının ortalama %2-6 arasında olduğu tahmin edilmektedir[23].

Servikal kanser vakalarının neredeyse tümü (%99) HPV enfeksiyonu ile ilişkilidir ve tüm serviks kanserlerinin yaklaşık %70'inden HPV tip 16 ve 18 sorumludur. HPV tip 18 enfeksiyonu saptanan kadınların %9'unda, HPV tip 16 saptananların ise yaklaşık %24'ünde serviks kanseri geliştiği bildirilmektedir.

Karadeniz bölgesinde 30-65 yaş aralığındaki yaklaşık 10.000 kadının kayıtlarının incelendiği bir çalışmada HPV prevalansı %10.9 olarak bulunmuştur[24]. Yakın zamanda sonuçlanan Erzurum ilinde 52 bin kadında HPV prevalansı ve sık görülen HPV tiplerine yönelik yapılan çalışmada kadınların %2,4'ünde HPV DNA pozitif saptanmıştır. En sık görülen tip HPV tip 16 iken tip 51 ve 56 sıklığında artış olduğu rapor edilmiştir[25].

Servikal karsinoma dışında HPV'nin bazı deri maligniteleri, baş ve boyun, oral kavite, orofarinks ve larinks kanserleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır[26, 27]. Nazal kavitede yerleşen papillom, displazi ve karsinomların bir kısmında HPV tip 6, 11, 57; oral kavitede izlenen fokal epitelyal hiperplazilerde HPV tip 6, 11, 13, 32; dudak siğillerinde tip 2; konjunktiva papillomlarında tip 6, 11; hipofarinks ve larinks kanserlerinde HPV tip 6 ve 16 saptanabilmektedir. Ayrıca virüsün melanom dışı deri kanserlerinde de rolü olduğu bildirilmiştir.

HPV anal kanserlerde %90, penil ve vulvar kanserlerde %40 ve orofarenks kanserlerinde %12 civarında saptanmıştır. Tüm kanserlerin %4'ünden HPV'nin sorumlu olduğu tahmin edilmektedir[28]. Servikal kanser gelişiminde temel risk faktörü HPV enfeksiyonu olmakla birlikte bu tek başına yeterli değildir ve bazı ek risk faktörlerinin eşlik etmesi gerekmektedir. Bunların en önemlileri HPV'nin tipi, enfeksiyonun kalıcılığı, cinsel partner sayısı, ilk cinsel aktivitenin erken yaşta olması, cinsel yolla bulaşan diğer hastalıkların varlığı, yaş, immün supresyon varlığı, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, sigara ve ailede serviks kanseri öyküsünün varlığıdır.

2.1.3- HPV Bulaş Yolları

HPV zarfsız bir virüs olduğu için dış ortam koşullarına nispeten daha dayanıklıdır ve pek çok ortamda aylarca canlılığını sürdürebilir. Ayrıca virüs partikülü ısıya da dayanıklı olup genellikle fiziksel ve kimyasal ajanlarla

inaktivasyona dirençlidir. Bu nedenle kontamine olmuş yüzey ve eşyalarla bulaş da olasıdır.

HPV deri ve mukozal yüzeylerdeki epitelyal hücrelere tropizm gösterir ve buralarda enfeksiyon oluşturarak proliferatif lezyonlara yol açar. Genital mukozadaki bazal epitel hücrelerin virüsle karşılaşmasının, cinsel temas yoluyla veya epitelin abrazyonu gibi minör travmaya maruz kalması sonucu geliştiği düşünülmektedir.[29]

HPV'de temel bulaş yolu cinsel temastır. Çoğu cinsel aktif yetişkin hayatlarının bir döneminde HPV ile enfekte olmaktadır ve enfeksiyon çoğunlukla asemptomatik seyretmektedir. Bu nedenle bu yaş grubunda hastalığın yayılımı çok daha hızlıdır. HPV koitus olmadan sadece cinsel temas yoluyla da bulaşabilmektedir. Bu yüzden kondom doğru şekilde kullanılmış olsa bile koruyucu olmayabilir. Genital bölgede HPV saptanan kişilerin el ve tırnaklarından alınan örneklerde de etken izole edilmiş ve bu kişilerin temas yoluyla çocuklarına veya cinsel partnerlerine HPV'yi bulaştırabildikleri gösterilmiştir[30].

Cinsel ilişki ile bulaşta en önemli faktörler cinsel partner sayısının fazla olması ve ilk cinsel aktivitenin erken yaşta olmasıdır[31]. Lezyonun lokalizasyonu, infeksiyöz viral partikül miktarı, travmanın şiddeti, HPV tipi ve bireyin bağışıklık durumu HPV bulaşını etkileyen diğer faktörlerdir. HPV infeksiyonu immün supresif tedavi alan hastalarda normal popülasyona nazaran daha sık (%43) görülmektedir. Özellikle hücresel immünitesi baskılanmış kişiler HPV infeksiyonuna daha duyarlıdır. Ayrıca bireyin kendinde veya cinsel partnerinde cinsel yolla bulaşan diğer hastalıkların varlığı, servikal veya penil kanser öyküsü, genital siğiller, anormal smear testi gibi faktörlerin varlığı HPV ile enfekte olma riskini arttıran diğer durumlardır [29].

HPV enfeksiyonlarının bulaşı için en iyi tanımlanmış risk faktörü cinsel partner sayısıdır. Kadınlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar ömür boyu cinsel partner sayısı ile genital HPV enfeksiyonuna yakalanma ve HPV ilişkili kanser gelişme riski arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir; aynı durum erkekler için de geçerlidir[32]. Oral seks, oral HPV bulaşının sebeplerindendir ve

baş boyun kanserleri ve orofarengeal kanserlerin %50-75'inde etyolojide HPV rol oynamaktadır. Yapılan bir meta-analizde oral seksin, oral kanserler için bağımsız bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir [3,34].

Çocuklarda ve bakirelerde HPV'nin saptanması cinsel temas dışında farklı bulaş yollarını düşündürmektedir[35]. Doğum sırasında enfekte anneden bebeğe perinatal geçiş görülebilir ve bunun sonucunda bebekte laringeal ve konjuktival papillomlar gelişebilir. Rekürren respiratuvar papillomatozis anneden bulaş sonucu ortaya çıkan ve en sık HPV tip 6 ve 11'in neden olduğu nadir görülen bir hastalıktır[35,36]. Vajinal yolla doğan bebeklerde doğum kanalından temasla etkenin alınması riski daha yüksek olsa da sezeryanla doğumlarda da potansiyel olarak bulaş riski bulunmaktadır. Latent HPV enfeksiyonu taşıyan spermin fertilizasyonu aşamasında ve maternal genital sistemin enfekte salgılarından asendan yayılım yoluyla tranplasental geçiş de olabileceği bildirilmektedir[37].

Yapılan çalışmalarda anne sütünde HPV varlığı gösterilememiştir. Bu nedenle annenin HPV pozitif olması emzirme için kontrendikasyon oluşturmamaktadır.

Enfekte nesneler yoluyla HPV bulaşı halen tartışmalı bir konudur. HPV'nin dezenfektanlara dirençli olması ve uzun süre dış ortamda persiste kalabilmesi nedeniyle enfekte yüzeyler veya nesneler yoluyla bulaş olabileceği ve HPV'nin nazokomiyal geçiş potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

İç ve dış anogenital sistemin elle muayenesi sırasında farklı eldivenler kullanılması önerilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda vajinal ultrason proplarının bulaş için bir kaynak olabileceği düşünülmüş ve yüksek düzeyli dezenfeksiyon önerilmiştir[38, 39].

2.1.4- HPV Yapısı ve Proteinleri

HPV, Papillomaviridae ailesi içerisinde yer alan, zarfsız, yaklaşık 8000 baz çifti (bç) uzunluğunda çembersel ve çift iplikli DNA'ya sahip, 50-55 nm büyüklüğünde, küçük DNA virüsüdür. İkosahedral kapsit yapısı elektron

mikroskopik olarak 12 penton ve 60 hekzondan oluşan toplam 72 adet kapsomerden meydana gelmektedir[1,40].

Virion, major ve minor olmak üzere iki yapısal kapsid proteini içerir. Major kapsid proteini HPV cinsine özgüdür ve tüm HPV tipleri için ortak antijenik özellik gösterir. Ayrıca virion ağırlığının %80'i de major kapsid proteini tarafından oluşturulur. Viral proteinleri kodlayan tüm dizinler tek bir DNA ipliği üzerinde yer alır ve viral genom toplam virion ağırlığının %12'sini oluşturmaktadır[41]. HPV'nin viral genomu üç major fonksiyonel bölge içerir.

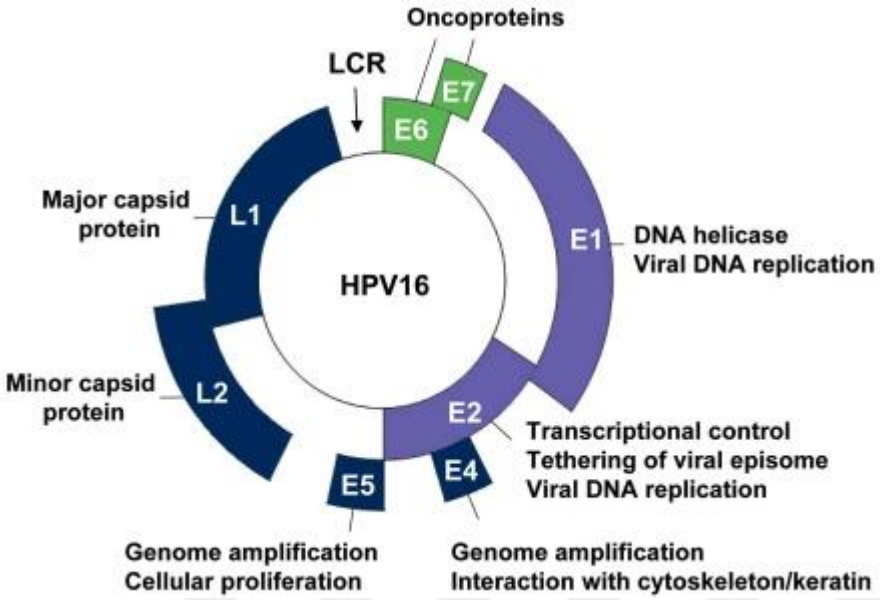
1. Erken bölge (early region, ER): Viral transkripsiyonun regulasyonu ve onkojenlerle ilgili proteinleri kodlayan bölgedir.

2. Geç bölge (late region, LR): Viral kapsit proteinlerinin senteziyle ilgili bölgedir.

3. Uzun kontrol bölgesi (Long control region, LCR; Upstream Regulatory Region, URR): Bu bölge kodlama yapmaz, ER ve LR bölgelerini birbirinden ayırır. Virüsün regülatuar fonksiyonlarını yürüten bölgedir.

Viral genom üzerindeki bu üç bölge, iki poliadenilasyon (pA) bölgesi ile ayrılır. Erken bölgede sekiz ve geç bölgede iki açık okuma bölgesi (ORF) vardır[42]. Bu ORF bölgeleri tek zincirli DNA'dan sentezlenen polsistronik mRNA'lar tarafından eksprese edilir.

Şekil 2. Papillomavirüslerin genetik yapısı [1]



Erken bölge [early reagion (ER)] proteinleri:

Enfeksiyondan hemen sonra üretilir. Viral replikasyon, transkripsiyon, hücresel transformasyon ve onkogenezis için gerekli yapısal olmayan proteinleri (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8) kodlar. E3 ve E8'in fonksiyonu henüz tam anlaşılamamıştır.

E1 proteini, 68 kDa'luk ATPaz, DNA helikaz ve DNA sarmalının açılması için aktiviteleri olan nükleer bir proteindir. Viral DNA replikasyonunun başlamasında ve sürdürülmesinde görevlidir. E1 proteininin replikasyon orijinine (Ori) bağlanma affinitesi düşüktür; ancak E2 proteini yardımı ile bu bağlanma aktivitesi artar ve E1-E2 kompleksi oluşur. Oluşan E1-E2 hekzamer kompleksi DNA'ya yüksek affinite ile bağlanır ve şaperon proteinlerin yardımı ile DNA'yı etkili bir şekilde açar. E1 DNA replikasyonunu aktive etmek için DNA polimeraz-α'nın subünitleri ile etkileşir. E1 hem viral DNA replikasyonunun başlamasında hem de replikasyon çatalında helikaz aktivitesine bağlı olarak elongasyonda rolü vardır [43].

E1 ve E2 genleri HPV'nin önemli regülatör proteinlerini kodlar; parabazal keratinositlerde bulunur ve viral epizomun stabilitesini sağlamakla görevlidir.

E1 proteini, enzimatik aktivitesi olan tek viral proteindir; bu nedenle yeni tedavilerin geliştirilmesi sürecinde dikkat çeken bir hedef olarak göze çarpmaktadır [44,45].

E2 proteini, E2 gen ürünü olan E2 proteini yaklaşık 50 kDa büyüklüğünde bir nükleer proteindir. E2 proteini prodüktif infeksiyon sırasında çeşitli roller oynar ve bazal hücrelerde viral DNA replikasyonunun başlaması ve genomun açılması için gereklidir. LCR bölgesindeki E2 bağlanma bölgelerine (E2BS) bağlanarak viral replikasyon ve transkripsiyonunun regülasyonunda önemli bir rol oynar. E2'nin, erken bölgenin transkripsiyonunda hem baskılayıcı hem de aktive etkileri olabilir. Genital HPV tiplerinde transkripsiyonu baskılayıcı, kutanöz HPV tiplerindeyse transkripsiyonu aktive edici etki gösterdiği saptanmıştır. Diferansiye hücrelerde E2, geç promoter bölgedeki değişimden dolayı transkripsiyonu baskılayıcı fonksiyonunu kaybeder. Bu durum, E1 ve E2 protein seviyelerinin ve viral DNA amplifikasyonunun hızlı şekilde artışı ile sonuçlanır.

İnsan servikal kanser hücrelerinin çoğunda, viral genomun integrasyonuna bağlı olarak E2 ekspresyon kaybının HPV'nin indüklediği karsinomanın gelişimine katkıda bulunduğu kabul edilmiştir. E2'nin aşırı ekspresyonu ile E6 ve E7 proteinlerinin transkripsiyonu baskılanır ve sonuçta apoptoza neden olur. Servikal kanser gelişim sürecinde sıklıkla E2 bölgesinde kırılma olur. Bunun sonucunda E2'nin, E6 ve E7 proteinleri üzerindeki baskılayıcı aktivitesi ortadan kalkar ve malignite indüklenir [45,46,47].

E3 proteini son yıllarda tanımlanmıştır ve fonksiyonuyla ilgili hala fazla bilgi yoktur. E3, E8 ile erken gen bölgesinde bulunur. E3 yalnızca birkaç HPV tipinde (HPV 1, 11, 16, 31, 33) tespit edilmiştir. HPV ile ilişkili kanserlerde E3 ve ubikitin ligazın birlikte çalıştığı gösterilmiş ancak mekanizması henüz aydınlatılamamıştır [42,48].

E4 proteini diğer erken proteinlerin çoğunun aksine infeksiyonun geç dönemlerinde bol miktarda sentezlenmektedir. Tam uzunlukta bir E4 proteini uç uca eklenmiş E1-E4 transkriptlerinden oluşmakta ve özellikle farklılaşmış suprabazal tabakada çok fazla miktarda eksprese edilmektedir[46,49].

Aminotermal ucundaki ilk beş aminoasitin E1 ORF, geri kalan kısmının E4 ORF bölgesi tarafından sentezlenmesiyle oluşan bir füzyon proteinidir. HPV'nin hayat döngüsünde E1-E4 proteinlerinin fonksiyonu hala net olarak bilinmemekle birlikte, bazı çalışmalar suprabazal hücre diferansiyonunun baskılanması, bazal hücrelerdeki epizomal yapının korunması ve viral amplifikasyon gibi değişik görevlerinin olabileceğine işaret etmektedir[50]. E1-E4 proteini özellikle sitoplazmada lokalizedir. HR HPV'nin E4 proteini infekte hücrelerin sitoplazmasında yaygın olarak dağılır ve keratin intermediate filamentleri (IF) ile organize filamentoz bir ağ yapısı oluşturur. İn vitro çalışmalarda hücrenin iskelet yapısını bozarak (sitoskeletal kollaps) virus salınımını kolaylaştırdığı gösterilmiştir[43].

E4 proteini yüksek riskli HPV tiplerinde bol miktarda eksprese edilir. E4 proteininin yüksek ekspresyon düzeyinin viral DNA replikasyonu ile korele olduğu ve diferansiye epitel hücrelerinde L1 ekspresyonundan önce meydana geldiği rapor edilmektedir. E4 proteininin HPV DNA replikasyonunu uyardığı ve geç viral fonksiyonları regüle ettiğini düşünülmektedir[46]. Ayrıca HPV ilişkili morfolojik değişikliklerden E4 proteini sorumlu tutulmaktadır; bunu da hücresel sitokeratinlerle etkileşimi sayesinde yapmakta olduğu düşünülmektedir [43].

E5 proteini, yaklaşık 5 kDa uzunluğunda, 83 aminoasitlik, küçük hidrofobik bir membran proteinidir. E5 proteini başlıca endoplazmik retikulum, golgi cisimcikleri ve aynı zamanda plazma membranlarında lokalizedir ve apoptozisi inhibe etmesi nedeniyle enfeksiyonun erken döneminde oldukça önemlidir.

Bu protein Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR), Koloni Stimüle Edici Faktör Reseptörü (CSF)-1 ve Trombosit Aktive Edici Faktör Reseptörü (PAFR) ile kompleks oluşturarak "Major Histocompatibility Complex" (MHC)/ İnsan Lökosit Antijeni (HLA) sınıf I ekspresyonunu ve Siklin Bağımlı Kinaz inhibitörlerini (CDKIs) baskılayarak hücre proliferasyonunu uyarmakta ve sonuçta malign dönüşüme katkı sağlamaktadır [49,51,52].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda E5 proteininin, viral amplifikasyonu ve diferansiye hücrelerde viral gen ekspresyonunu modüle etmede E7 proteini ile sinerjistik etki gösterdiği saptanmıştır. E5 proteininin, endozomal

maturasyonda ve konak antijen sunan hücrelerde değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir. E5 varlığı hücrelerde yüzey HLA-A ve HLA-B seviyelerinin azalmasına yol açar[44]. E5 proteini apoptozu takip eden DNA hasarında da rol oynamaktadır.

Servikal kanser lezyonlarında, konak DNA'sı ile viral DNA sıklıkla birbirine entegre olur. Bu nedenle bu proteini kodlayan dizi de dahil olmak üzere genomun önemli bir kısmında delesyon olmaktadır. Bu sebeple HPV ilişkili karsinogenezin geç dönemlerinde E5 proteinin tespit edilme olasılığı düşmektedir [46,51].

E6 ve E7 proteinleri, E6 ve E7 erken genlerinin ekspresyonuna bağlı olarak sentezlenen ve HPV ilişkili maligniteden sorumlu olan iki majör HPV onkoproteinidir. HPV tiplerinin onkojenik fonksiyonları özellikle bu iki erken genin ekspresyonuna bağlıdır.

E6 onkoproteini yaklaşık 17 kDa büyüklüğündedir ve konak hücrenin hem nükleus hem de sitoplazmasında dağınık olarak bulunmaktadır[46]. Yüksek riskli (HR) HPV'lerde E6 proteinlerin iyi bilinen fonksiyonlarından biri p53'ün yıkımı yoluyla insan hücrelerini transforme etme kabiliyetidir. P53 proteini hücredeki DNA hasarlarını gidermek için hücre döngüsünü durdurur ve gerekli onarımın yapılmasını sağlar veya apoptozu uyarır. Düşük riskli (Low risk; LR) HPV alt tiplerinde E6 proteinlerinin p53'e düşük afinite ile bağlandığı gösterilmiştir. E6, p53'e ubiquitin ligaz olarak isimlendirilen E6 ilişkili protein (E6AP) ile bağlanır. E6-E6AP-p53 kompleksinin oluşumu, ubiquitin bağımlı proteolitik yol vasıtasıyla p53'ün hızlı yıkılımı ile sonuçlanır. Böylece p53 aracılı hücre apoptozisini ve hücre siklusunun regülasyonunu ortadan kaldırır. E6 aynı zamanda bir p53 aktivatörü olan p300/CBP'yi hedefler ve indirekt olarak p53 aktivitesini azaltır [43].

E6 proteini, telomeraz aktivitesini indükleyerek de hücre apoptozisi üzerine inhibitör etki oluşturur ve böylece enfekte hücreler sürekli olarak çoğalmaya devam eder [53]. İnsan telomeraz revers transkriptaz enziminin, ökaryotik kromozomların telomerlerini uzatma özelliği vardır. Telomeraz aktivitesi olmadan telomerler hücre bölünmesi sırasında kısalır ve hücreler kromozom

replikasyonunu sonlandırır ve yaşlanma meydana gelir. Sonuç olarak HR-HPV tiplerin E6 proteinleri transkripsiyonal düzeyde telomerazı aktive eder, insan hücrelerinin ölümsüzleşmesine yol açar[44].

E7 onkoproteini yaklaşık 12 kDa ağırlığında ve öncelikle nükleusta lokalize bir proteindir. Temel hedefi retinoblastom proteini (pRb) ve pRb'nin ilişkili olduğu diğer proteinlerdir. Rb proteini, DNA hasarına bağlı olarak apoptozu uyarır; hücre siklusunun G1'den S fazına geçişini inhibe eder ve hücre döngüsünü durdurur. Rb ailesi içindeki diğer proteinler p107 ve p130'u içerir. Her ikisi de proteinlerin ekspresyonunu olumsuz yönde etkiler ve hücre siklusunun devamı için gereklidir[29].

Rb proteininin aktivitesi fosforilasyon ile düzenlenir. HPV ile enfekte hücrelerde, E7 proteinlerinin hipofosforile Rb proteinlere bağlanması Rb proteininin inaktivasyonu ile sonuçlanır ve hücre siklusunun S fazına ilerlemesine izin verir. LR-HPV alt tiplerinde E7 proteinlerinin Rb'ye düşük afinite ile bağlandığı gösterilmiştir.

E7 proteini yüksek riskli HPV alt tiplerinde hem hücresel transformasyon hem de viral patogenez için gereklidir. E7 proteini apoptozisi ve sitokin bağımlı hücre ölümünü inhibe edebilir. Bunun yanı sıra tam tersi olarak çeşitli yollarla apoptozisi indükleyebilir[47,54]. E6 ve E7 proteinlerini içeren HPV alt tipleri onkogenez açısından yüksek risk taşımaktadır [45].

E8 proteini, HPV tip 31 (HPV-31), sığır papillomavirus tip 1 (BPV-1) ve birçok tavşan papillomavirüslerinda onkogen olarak saptanmıştır. E8-E2 füzyon proteininin replikasyon ve viral transkripsiyonda negatif bir regülatör olduğu gösterilmiştir. E8-E2 füzyon proteini, E2 geninin C terminal ucuna bağlanarak viral transkripsiyon için alternatif bir yol meydana getirmektedir. E8-E2C'nin, viral yaşam siklusunun erken dönemi süresince viral kopya sayısının kontrolüyle ve DNA replikasyonunu sınırlaması sayesinde HPV epizomlarının stabilitesinde etkili olduğu düşünülmektedir[55].

Geç bölge [late region, (LR)] proteinleri:

L1 ve L2 proteinleri

Viral genom üzerindeki geç gen bölgesi yaklaşık 3 kb uzunluğundadır; L1 ve L2 genlerini içerir. L1 geni, viral protein kılıfının büyük bir kısmını meydana getiren majör kapsid proteinini oluştururken, L2 geni minör kapsit proteinini oluşturmaktadır[43].

L1 geni yaklaşık 55 kDa, L2 ise yaklaşık 74 kDa ağırlığındadır ve bu proteinler enfeksiyonun geç dönemlerinde üretilmektedir. L1 korunmuş virion bölgesidir; tüm HPV tiplerinde ortaktır ve taksonomik olarak farklılaşmayı sağlar [43]. L1 bölgesi yeni virüslerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Yeni bir papilloma virüs izolatı, L1 bölgesindeki DNA dizisinde mevcut papilloma virüslerden %10'dan fazla farklılık taşıyorsa yeni bir papilloma virüs olarak tanımlanmaktadır. DNA dizisinde %2–10 arasında veya %2'den az farklılık gösteriyorsa alt tip olarak tanımlanmaktadır [56].

L1'e karşı oluşan nötralizen antikorlar hücresel immün cevapta etkilidir ve HPV aşılarının hedef bölgesi olan VIP'ler L1 proteininden oluşmaktadır. L1 proteini yüzey reseptörlerine bağlanarak hücreye girişte etkin olarak rol almaktadır. Virüsün ortak antijenik özelliğinden sorumlu olup, hafif-orta displazilerde ve nadir olarak şiddetli displazilerde saptanabilmektedir [57,58].

L2 minör kapsid proteini HPV tipleri arasında farklılık gösterir. Tiplerin antijenitesindeki farklılıktan sorumludur[59]. L2 hücre yüzey proteinine bağlanarak virüsün hücre sitoplazmasından çekirdeğe geçmesini sağlar. L1 proteinlerinin tek başına viral kapsid yapılarına dahil olduğu L2 proteininin ise DNA'ya bağlanma ve enkapsidasyon aşamalarından sorumlu olduğu ileri sürülmektedir[58].

Uzun kontrol bölgesi (LCR; long control region):

Viral genom üzerinde 400-700 baz çiftinden oluşan, kodlama yapmayan ve viral DNA replikasyon orijinini bulunduran bölgedir. Erken ve geç bölgeler arasında yer alır. Aynı zamanda üst regülatör bölge (URR; upstream regulatory region) olarak da isimlendirilir. Viral replikasyon ve transkripsiyonda

görevli düzenleyici dizileri içerir. Bu bölge protein kodlamaz (non-coding region); replikasyon orijinini, transkripsiyon düzenleyici dizileri ve erken proteinlerde ortak olarak bulunan N terminal dizilerini içermektedir [51].

2.1.5. HPV Sınıflandırma

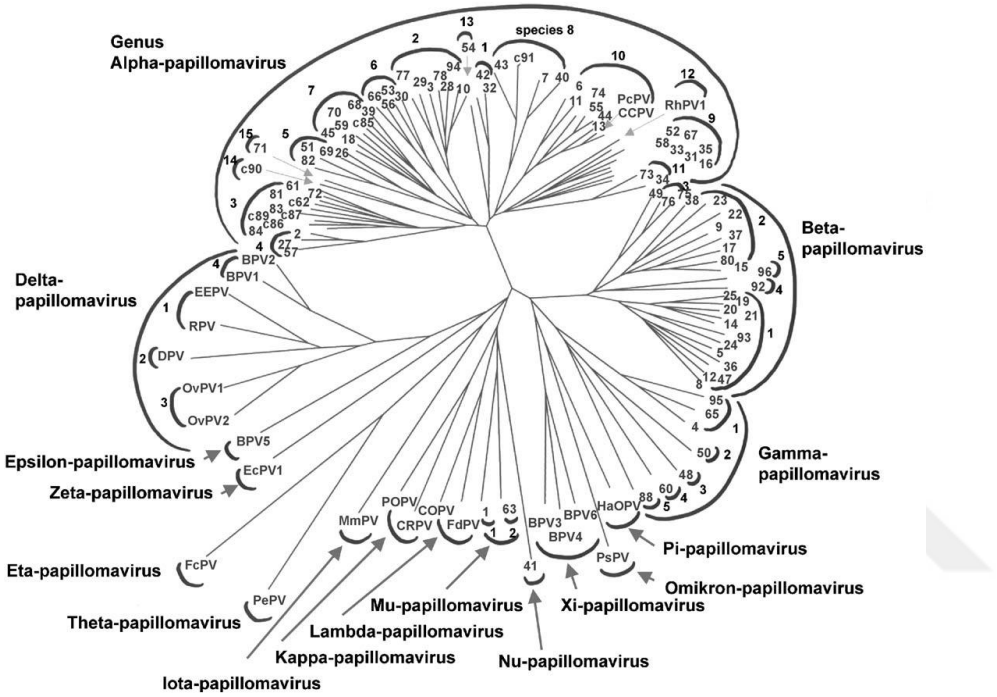
Papillomaviruslar deri ve mukoza epitelini infekte eden DNA virusları olup papillomaviridae aile içerisinde yer alır. 1950-1960'lı yıllarda, Papillomaviruslar (PV) ve Polyomavirusların yapılan elektron mikroskobik incelemeleri ve nükleik asit analizleri sonucunda her iki grubun ikosahedral simetrili, zarfsız, çift iplikli ve sirküler DNA genomuna sahip partiküller olduğu gözlemlenmiştir.

Nükleik asit yapısı, morfolojik yapısı ve transformasyon özellikler ile benzer oldukları düşünülerek bu virüsler tek bir aile içerisine dahil edilmişlerdir. Bu aileye ilk iki harflerinin birleşiminden oluşan Papovaviridae ailesi (papillomavirüsler, polyomavirüsler ve simian vacuolating virüsler) adı verilmiştir. 1980'lerde Danos ve ark. larının yaptığı çalışmalarda bu ilişkinin çok yüzeysel olduğu gösterilmiştir[60]. Tüm polyomavirusların genom büyüklükleri yaklaşık 5 kb iken, Papillomavirüslerin 8 kb civarındadır. Papillomavirüslerde transkripsiyon bir yönde gelişirken, polyomavirüsler iki transkripsiyon alt birimi içerirler. En önemlisi Polyomavirüsler ve Papillomavirüsler; T-antijenleri ve E1 genindeki çok küçük homolog bir segment dışında herhangi bir nükleotid asit veya aminoasit dizi benzerliği içermemektedir. Yapılan bu genomik incelemelerden sonra bu virüslerin farklı ailelerden olduğu sonucuna varılmış ve yakın zamanda bu aile Uluslararası Virüs Taksonomi Konseyi (ICTV; International Council on Taxonomy of Viruses) tarafından, *Polyomaviridae* ve p*apillomaviridae* olarak iki ayrı virüs ailesi olarak gruplandırılmıştır[56,61].

Papilloma virüslerde genom içinde en iyi korunan gen bölgesi L1 ORF (Open Reading Frame; açık okuma çerçevesi) DNA dizi bölgesidir ve yeni HPV tiplerinin tanımlanmasında bu bölge kullanılmaktadır. Farklı izolatlardaki DNA dizi benzerliği yüzde (%) olarak karşılaştırılmakta ve aynı türdeki diğer HPV tiplerinin DNA'sına %50' den daha az homoloji gösteriyorsa yeni bir genotip olarak kabul edilmektedir. Günümüzde Yunan harfleri ile belirtilen 16 farklı HPV genusu tanımlanmış olup bunların beşi alfa, beta, gama, mü ve nü HPV

genusları; diğer yedisi ise maymun, kuş ve çeşitli memelilerde görülen papillomavirus alt tipleri olarak bilinmektedir. HPV'nin L1 proteinindeki DNA sekans bölgeleri baz alınarak yapılan filogenetik sınıflandırmaya göre 96 HPV tipi ve 22 hayvansal papillomavirus tipi tanımlanmıştır [62]. HPV'nin filogenetik sınıflandırması Şekil 3'te gösterilmektedir.

Şekil 3: Human papillomavirüsün filogenetik sınıflaması [56]



Klinik açıdan önemli ve en büyük grup olan alfa papillomavirus genusu, deri, mukozal ve genital lezyonlarla ilişkili tüm HPV tiplerini içermektedir. Bu cins içindeki düşük riskli tipler benign ve yaygın siğillere, yüksek riskli tipler ise serviks kanserine neden olmaktadır.

Beta cinsi latent enfeksiyonlara yol açar ve Epidermodisplazia Verrusiformis (EV) ile ilişkili HPV tiplerini içerir. Fakat İmmün suprese bireylerde enfeksiyon bölgesinde cilt neoplazilerine de sebep olabilmektedir[63,64]. Gama, mu ve nu cinsleri ise genellikle benign cilt lezyonlarına yol açabilmektedir[52]. Gama ve beta cinsleri yapılan son çalışmalarda oral mukoza gibi farklı bölgelerde de saptanmıştır [65]. İnsanlarda

bugüne kadar 230 farklı HPV türünün varlığı bildirilmiş ve bunlar cinslerine göre sınıflandırılmıştır.

Virüsün farklı tipleri, enfekte ettiği epitel hücresinin tipine göre farklı dokulara yönelim gösterir. Bu yönelime göre de mukozal ve kutanöz tipler olarak iki gruba ayrılmaktadırlar;

- Anogenital bölgenin malign ve benign lezyonlarından izole edilen 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 mukozal tipleri oluşturur.
- Yaygın deri ve plantar siğillerden izole edilen HPV tip 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 ve 65 ise kutanöz tipleri oluşturur [66].

HPV tipleri onkojenik risk potansiyellerine göre üç grupta sınıflandırılır: Düşük risk, olası (muhtemel) yüksek risk, yüksek risk. Bu grupların oluşmasında E6-E7 proteinlerinin tümör supresor proteinlerini bağlayarak malign potansiyele neden olması etkilidir[67]. Onkojenik risk potansiyellerine göre HPV tipleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Human papillomavirüs klasifikasyonu

Risk Sınıflaması	**HPV Tipleri**
Düşük riskli (LR-HPV)	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81
Olası yüksek riskli	26,53,66
Yüksek riskli (HR-HPV)	16,18,31,33,35,39,45,51,52,55,56,58,59,66,68,73,82,83

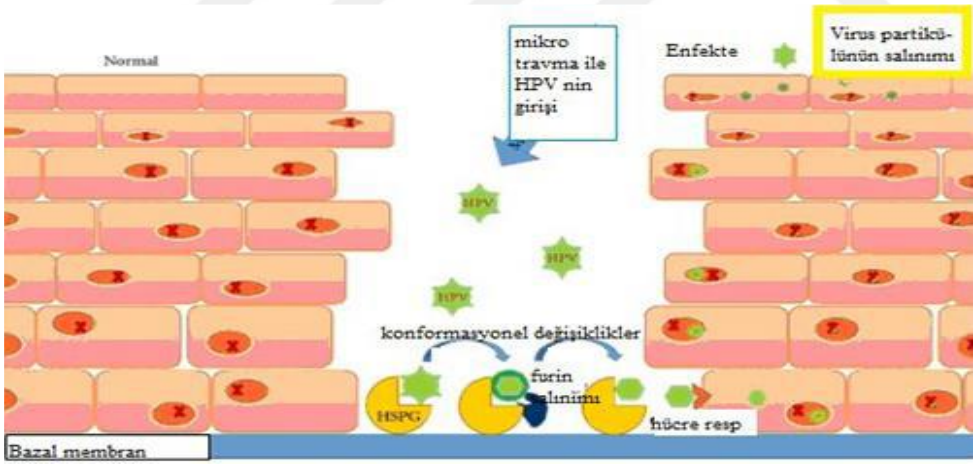
Düşük riskli HPV tiplerinin çoğunlukla kutanöz ve genital siğillere, daha nadir olarak da respiratuvar papillomatoza yol açtığı bilinmektedir. Yüksek riskli HPV tipleri ise serviks kanseri olgularının tamamında saptanmıştır ve tüm insan kanserlerin yaklaşık %15-20'sinden sorumlu tutulmaktadır[68]. Yüksek riskli tiplerden olan HPV tip 16 ve 18, serviks kanseri riskinde yaklaşık 200 kat

artışa neden olmaktadır. Ayrıca bu iki tipin, tüm serviks kanserlerinin yaklaşık %71'inden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar, HPV tip 16'nın yüksek riskli (HR) HPV'ler içinde en kanserojen tip olduğunu göstermektedir [69].

2.1.6. HPV Patogenez ve İmmünite

HPV'nin hayat siklusu epitel hücrelerindeki farklılaşmaya bağlıdır. Papillomaviruslar deri ve mukoz membranların skuamöz epitel hücrelerini enfekte ederek burada replike olur ve epitelyal proliferasyona yol açarlar. Enfeksiyon için öncelikle epitelde mikroabrazyon olması ve virüsün bu bölgeden hücre içine girmesi gerekir. Virüs partikülleri epitel hücrelerinin bazal membranındaki bazal hücrelere tutunur ve burada prolifere olurlar [64,70]. Bu süreçte hücrelerde yara iyileşmesi benzeri bir yanıt görülmektedir. Sınırlı ve intakt bazal membrana sahip olan bu lokalize hiperplaziye verruka veya papillom adı verilir[71]. HPV'nin servikal bazal membrana ulaşması ve invazyonu Şekil 7'de gösterilmiştir.

Şekil 4: HPV'nin mikrotravma sonucu servikal bazal membrana ulaşması [71]



Konağın bağışıklık sistemi tarafında enfeksiyonların çoğu lezyon oluşmadan önce ortadan kaldırılır. Papillomaların genellikle enfekte bir bazal hücrenin monoklonal şekilde çoğalması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Sıklıkla virüsün inokülasyonundan itibaren 6 hafta ile 2 yıl gibi bir zaman aralığında papilloma oluşumunun gerçekleştiği görülmektedir.

Virüs kapsidi iki protein yapıdan oluşur. L1 proteini primer yapısal proteindir ve 360 protein kopyası 72 kapsomer içinde organize olur. L2 minör viral proteindir ve tek L2 molekülünün virion partikülünün köşelerinde pentavalan kapsomerlerin merkezinde olduğu düşünülür. Her iki protein de virüsün enfektivitesinde önemli rol oynar[72].

Enfeksiyonun başlangıç döneminde HPV'nin L1 majör kapsid proteini yoluyla epitel hücrelerinin yüzeyinde veya bazal membranda bulunan heparin sülfat proteoglikanlara (HSPG'ler) bağlandığı gösterilmiştir. HPV'nin ekstraselüler matrikse bağlanması laminin 332 ile gerçekleşir ve bu reaksiyon viriyonların hücreye yapışmasını kolaylaştırır. Heparan sülfat proteoglikan (HSPG) ile L1 etkileşime girer, kapsid yapısal olarak değişime uğrar ve L2 meydana gelir.

Papillomavirüs partiküllerinin L2 varlığında daha etkili paketlemesi sağlanır ve virüsün enfektivitesi artar. HPV 31'de L2 proteini kaybının, paketleme etkinliğinde 10 kat, virüs enfektivitesinde 100 kat azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Hücre yüzeyinden virus salınımı E4 proteini ile kolaylaştırılır. E4 keratin ağını bozar ve kornifiye mebranın bütünlüğünü etkiler [29,46].

HSPG'ler, kovalent olarak bağlanmış heparan sülfat (HS) glikozaminoglikanlara sahip bir hücre yüzeyi veya matris proteininden oluşur ve çeşitli biyolojik aktiviteleri düzenlemenin yanı sıra çok sayıda viral ve bakteriyel patojen için bağlayıcı reseptör işlevi görürler [73].

HPV'lerin yaşam döngüsü bazal hücrelerin keratinositlere farklılaşmasına bağlı olduğundan, bunu in vitro olarak incelemek zor olabilir. Bu nedenle yerli virionlara alternatif olarak virüs benzeri parçacıklar (VLP) geliştirilmiştir. Şu anda bu alandaki araştırmacılar tarafından kullanılan iki tür VLP vardır; L1 VLP ve L1L2 VLP.

L1 majör kapsid proteini tek başına eksprese edildiğinde, ikosahedral yapıya sahip bir L1 VLP'ye kendiliğinden birleşebilir. Eğer L1 proteini ve L2 minör kapsid proteini aynı anda eksprese edilirse, proteinler L1L2 VLP'ye

birleşir[74]. Bu VLP'ler böcek hücrelerinde, memeli hücrelerinde ve mayalarda (örn. *Saccharomyces cerevisiae*) üretilebilmektedir [75,76].

VLP'lerin doğal virionlara olan genel yapı benzerliği, konformasyonel epitopların sunulmasına izin verirken, viral genomu içermemesi nedeniyle bulaşıcı veya patojen kabul edilmemektedir. Sonraki aşamada psödovirionlar (PsV) olarak adlandırılan haberci DNA plazmidlerini içeren parçacıkların geliştirilmesi, raportör plazmid gen transdüksiyonu yoluyla konakçı hücre enfeksiyonunun doğrulanması, ölçülmesi ve olası DNA kaynaklı kapsid yapısal değişikliklerinin araştırılmasına olanak sağlamaktadır.

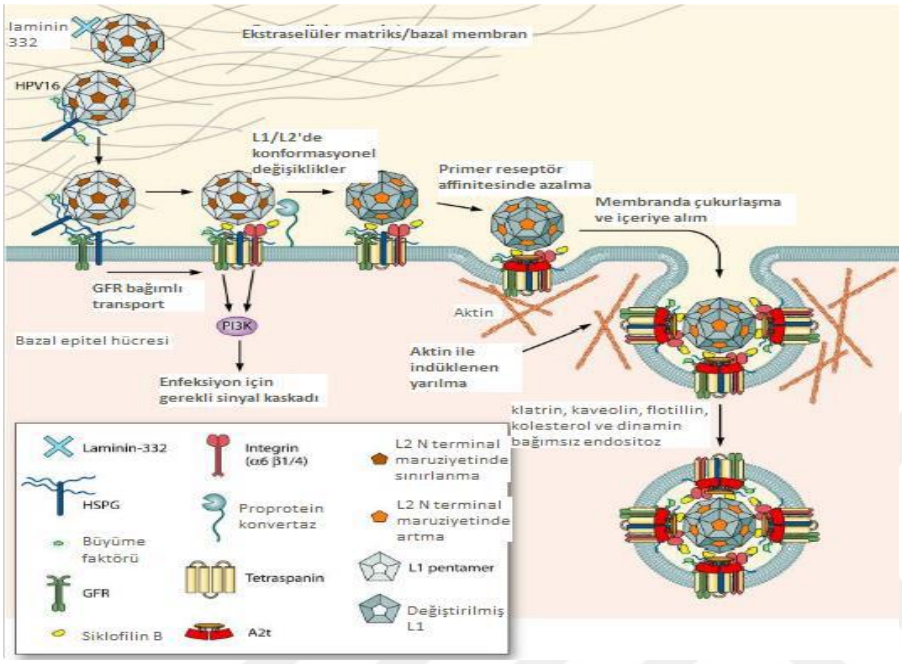
Son olarak, organotipik (raft) kültür sistemlerinin geliştirilmesi in vitro epitel hücre farklılaşmasına olanak tanımış ve HPV31, HPV18 ve HPV16 gibi enfeksiyöz potansiyele sahip olduğu gösterilen virionların üretilmesini sağlamıştır[77,78]. Bu sistemler papillomavirüsün bazal epitel hücresine bağlanması ve girişinin incelenmesi için eşsiz imkanlar sağlarken, ortaya çıkan parçacıklar ince yapısal ve işlevsel farklılıklara sahiptir. Araştırmalar L1 VLP, L1L2 VLP ve PsV'nin hücrelerle farklı şekilde etkileşime girdiğini göstermekte ve bunların uygun tartışma ve yorumlama imkanları olmadan birbirinin yerine kullanılamayacağını göstermektedir[78].

Büyüme faktörü reseptörleri aynı zamanda erken virion-konakçı hücre etkileşimleri sırasında sinyalleşme basamaklarını aktive edilebilir. Keratinosit Büyüme Faktör Reseptör (KGFR) ve/veya Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR), HSPG/Büyüme Faktörü HPV16 kompleksleri yoluyla aktive olur ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolağının aktivasyonuyla hücre içi sinyal iletim basamakları aktiflenmiş olur.

Virionda, HSPG'lara bağlanmanın ardından bir dizi konformasyonel değişiklik meydana gelir. Bu değişiklik L2'nin N terminal ucunda daha çok aminoasit açığa çıkaran siklofilin B (CypB) vasıtasıyla kolaylaştırılır. Sonrasında HPV 16, ikinci bir hücre içi sinyal iletim kaskadını başlatan α6 integrine bağlanır. HPV16'nın kapsidinde konformasyonel değişiklikler ve sinyal iletiminden sonra, anneksin A2 heterotetramerine (A2T) bağlanır. Bu bağlanma HPV16'nın, caveolin-, klatrin-, lipidraft-, flotillin-, kolesterol- ve

dynamin- bağımsız endositozunu başlatır [79]. HPV 16'nın insan servikal hücresi içine girişi Şekil 5'te gösterilmiştir.

Şekil 5: HPV 16'nın hücre içine giriş mekanizması [79]



HPV bazal tabaka hücrelerine girdikten sonra burada az miktarda yapısal olmayan erken proteinlerden E1, E2, E6 ve E7'yi (öncelikle E1 ve E2) sentezler. Hücreye giriş ve soyulmadan sonra, viral DNA'nın nükleusa transferi gerçekleşir. L2 viral DNA'nın nükleusa transferini kolaylaştırır. Nükleusa giren viral genomun tek zinciri, konak DNA'sına tutunup entegre olur ve yeni viral genom sentezi gerçekleşir. Enfeksiyon süresince enfekte hücreler, hücre başına 50-100 viral genom üretilmesine aracılık eder. Daha sonra diğer erken proteinler ve en son yapısal kapsid proteinleri olan L1 ve L2 sentezi gerçekleşir. Bu şekilde önce viral DNA, sonra kapsid sentezi gerçekleşir ve yeni virion oluşumu tamamlanmış olur[46,80].

Normal derinin bütün tabakalarındaki hücreler viral genomu içerir ancak viral genlerin ekspresyonu hücrelerin diferansiyasyon durumuna bağlıdır. Bazal hücreler prolifere oldukça epizomal viral DNA'lar yeni hücrelere yayılır ve enfekte hücrelerde diferansiyasyon başlar. Suprabazal bölgedeki

diferansiye hücrelerde E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 proteinlerinin yüksek düzeyde ekspresyonu ile viral genom replikasyonunda belirgin artış olur [81].

HPV epizomları konak hücre DNA'sı ile replike olur ve hücre bölünmesi sırasında enfekte yavru hücreler bazal tabakadan suprabazal tabakaya göç eder ve burada farklılaşır. DNA replikasyonu ve erken genlerin ekspresyonu bazal hücrede mevcutken, geç gen ekspresyonu ve viral partikül sentezi keratinize tabakada gerçekleşir. Papillomun en yüzeysel tabakası olgun viral partikülleri içerdiğinden bu lezyonlar bulaşıcı özellik göstermektedir. HPV'nin dokudaki etkileri temel olarak üç farklı şekilde görülebilmektedir; latent enfeksiyon, prodüktif enfeksiyon ve non-prodüktif enfeksiyon.

Latent enfeksiyon döneminde virionlar epitelyal yarıklardan bazal hücrelere ulaşarak burada enfeksiyon oluşturur. Bu dönemde viral genom hücre içinde ayrı bir epizomal DNA olarak kalır. Enfekte hücreler normal hücrelerden histolojik olarak ayırt edilemez. Birkaç hafta veya yıllar sürebilen bir kuluçka dönemi sonrasında virüs replikasyonu başlar [82].

Prodüktif enfeksiyon olarak adlandırılan viral replikasyon döneminde, yüzeyel epitelde perinükleer halo, sitoplazmik vakuolizasyon ve sıklıkla hiperkromatik, büyük nükleus ile karakterize hücresel transformasyon olan "koilositoz" meydana gelir. Hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon ve koilositoz varlığı HPV enfeksiyonlarının histopatolojik olarak karakteristik özelliğidir [43]. E6 ve E7'nin konak DNA sentezini uyarmasıyla hiperkromazi ve nükleusta büyüme görülür. Ardından E4'ün keratin ağlarda bozulmaya yol açmasıyla karakteristik koilositik görüntü ortaya çıkar. Virüs replikasyonu ile epidermis ve diğer tabakalarda proliferasyonda aşırı bir artış olur. Hücrelerde hiperkeratoz ve hiperplazi meydana gelir.

HPV servikal epitelin bazal tabaka hücrelerinde proliferasyon ile spinöz tabakada hücre sayısında artışa (akantozis) sebep olur. Sonuçta deride kalınlaşma ve keratin üretiminde artış (hiperkeratoz) gözlenir. Oluşan epitelyal uzantılara (papillomatozis) "kondilom" adı verilir. Kondilomlar gözle görülebilen aşikâr lezyonlar olabileceği gibi, yalnızca kolposkopi ile saptanabilen vajen, vulva ve serviks yerleşimli lezyonlar şeklinde de görülebilir. Kimi zaman dev

boyutlara ulaşır ve Buscke-Lowenstein tümörü olarak adlandırılır. Kondilomlara en çok yol açan tipler HPV tip-6 ve tip-11'dir [81,83]. HPV genelde hücrelerde lizise neden olmaz ve dolayısıyla sistemik dolaşıma katılarak viremiye yol açmaz [81].

Viral genom, karsinogenezis sürecinin ilk zamanlarında (High-Grade Skuamöz İntraepitelyal Lezyon-HSIL evresine kadar) enfekte ettiği hücrelerin çekirdeği içinde epizomal olarak kalır. Bu onkojenik süreçte ilerleme olursa epizomal DNA'lar yeniden konak DNA'sına bağlanır (HSIL ve daha ileri lezyonlar gibi). Genellikle bu bağlanma konak DNA'nın kırılgan bölgelerine yakın alanlardan olur. Viral DNA'nın bu şekilde konak DNA'sına bağlanması, malign dönüşümün başladığını düşündürmektedir. Sonrasında HPV konak hücre içerisinde onkojen proteinler sentezleyerek malign dönüşüme neden olmaktadır. Özellikle E6 ve E7 proteinleri p53 ve Rb tümör supresör genlerine bağlanarak hücrede ölümsüzleşme, genomik instabilite, apoptozis inhibisyonu ve kontrolsüz bir proliferasyona yol açmaktadır[84].

E6 ve E7 onkoproteinlerine ve bazı konak faktörlerine ek olarak hücrelerin transformasyonu serviks kanseri gelişiminde etkilidir. Konak kromozomuna HPV epizomunun integrasyonu sonucu çembersel DNA E1-E2 gen bölgesinden açılır ve bu durum E2 ve E4'ün bir kısmının delesyonuna neden olur. E6/E7 ekspresyonun negatif düzenleyicisi olan E2 geninin parçalanması ile yüksek düzeyde E6/E7 mRNA ekspresyonu gerçekleşir. E6 proteini p53'ün yıkılmasına ve telomerazın aktivasyonuna neden olur. Benzer ve sinerjistik olarak E7 proteini de Rb proteinini degrade ederek transkripsiyon faktörü EF2'nin inhibisyonunu önler.

Veriler HPV E5 geninin de hücrede transformasyon oluşturma kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. E5 proteini enfekte farelerde tümör oluşturma yeteneğine sahipken, epidermal büyüme faktörü (EGF), E5 geni ile yardımlaşarak koloni büyüklüğünü artırabilmektedir [85,43,86].

Papillomavirusların karsinojenik potansiyeli multifaktöryel sebeplerle açıklanmaya çalışılmaktadır. Hücresel bir transformasyonun meydana gelmesinde papillomaviruslar gerekli, ancak eşlik eden diğer faktörlerin

olmadığı durumlarda yetersizdir. HPV'nin transformasyon kapasitesi temel olarak büyüme düzenleyici yolakları bozan E6 ve E7 onkoproteinlerinin aktivitesinden kaynaklanmaktadır.

HPV enfeksiyonları çoğunlukla asemptomatik ve geçicidir. Sağlıklı bir kişide ortalama 2 yıl içinde bu enfeksiyonların %90'ı vücuttan temizlenmektedir. Viral infeksiyon gelişmesi durumunda da genellikle lokal olarak kalır veya spontan kaybolur, nadiren immün sistemi baskılanmış hastalarda yayılım gösterebilir.

HPV, intraselüler, latent ve non-litik infeksiyonlara yol açtığı ve aynı zamanda viremiye neden olmadığından dolayı immün yanıt geç ve az miktarda oluşur. HPV'ye karşı antikor oluşumu HPV DNA tespitinden yaklaşık 8-18 ay kadar sonra ve çok düşük düzeyde gelişir. Antijen uyarımı düşük olduğundan B ve T hücrelerinin yüksek oranda aktive olması engellenir. Birçok çalışma HPV enfeksiyonlarında vakaların yaklaşık yarısında serolojik yanıt oluştuğunu bildirmektedir. Ancak düşük seropozitivitenin de koruyuculuk sağladığı düşünülmektedir[87,32].

Enfeksiyonun temizlenmesinde konağın immün cevabı büyük rol oynamaktadır. Persistan enfeksiyon gelişmesiyle zayıf immün cevap arasında kuvvetli bir ilişkinin varlığı gösterilmiştir. İmmün cevapta başlıca T lenfositler, doğal öldürücü (NK) hücreler ve Langerhans hücreleri rol oynamaktadır. Kondilomalarda ve servikal intraepitelyal neoplazi (CIN)'de, yardımcı/sitotoksik T hücre oranında ve Langerhans hücre sayısında düşme, NK hücrelerinde IL2 ve interferon gama (IFN-gama) üretiminde azalma olduğu gösterilmiştir[32].

HPV enfeksiyonuna karşı oluşan immün cevapta lokal hücresel immünite de etkilidir. Bu da nötralizan antikor (L1 proteinine karşı oluşur) gelişimine ve lezyonlarda gerilemeye katkıda bulunur. HPV'nin majör kapsit proteini olan L1'e karşı gelişen tip spesifik IgG ve IgA antikorları serum ve servikal sekresyonlarda tespit edilir ve koruyucudur. Ancak HPV infeksiyonu geçirmiş kişilerin hepsinde bu antikor cevabı oluşmamaktadır. Servikal kanseri olan HPV tip-16 DNA pozitif saptanan kadınların yaklaşık %50'sinde serum IgG antikor cevabı oluşmakta ve yıllarca kalabilmektedir.

Epidemiyolojik olarak HPV tip 16 ve 18'in servikal displazi ve kanserle yakın ilişkisinin saptanmasının yanı sıra in vitro olarak hücre kültürlerinde transformasyon kapasiteleri de gösterilmiştir. Serviks skuamöz hücre karsinomlarının %99'dan fazlası skuamöz hücrelerin onkojenik papillomavirüs tipleri ile infeksiyonuna bağlıdır [85,43].

2.1.7- HPV İlişkili Hastalıklar

Human papillomavirüs (HPV) deri, anogenital bölge, larinks ve özofagusu enfekte edebilen epiteliotropik, çift zincirli bir DNA virüsüdür. HPV enfeksiyonları asemptomatik ve benign lezyonlardan tekrarlayıcı ve tedaviye dirençli proliferatif tablolara kadar geniş bir yelpazede karşımıza çıkabilmektedir. Klinik tablodaki bu değişkenlik kişinin bağışıklık durumuna, lezyonun yerine, epitelin yapısına ve virüsün tipine bağlı olabilir [88].

Asemptomatik enfeksiyon herhangi bir klinik bulgu vermezken, yalnızca HPV DNA testi ile saptanabilir. Genital siğiller birkaç ay içinde gözle görülür hale gelebilirken, serviks kanseri gelişimi herhangi bir klinik bulgu olmadan yıllarca devam edebilir [42]. En sık görülen HPV ilişkili benign hastalık anogenital siğiller iken, en sık görülen malign hastalık da serviks kanseridir [9]. HPV bunların dışında ciltte ve mukozalarda siğillere, nazofarengeal papillomlara, vajina, vulva, penis, anüs ve baş boyun kanserlerine de yol açmaktadır [89].

2.1.7.1- Deri Siğilleri

En sık çocuklarda ve gençlerde verrüköz lezyonlar şeklinde ortaya çıkar ve derinin tüm tabakalarında hipertrofi, akantozis, hiperkeratoz ve papillom oluşumu ile giden benign lezyonlardır. Çoğunlukla spontan iyileşme gözlenir. Genellikle normal siğillerle HPV 2; düz siğillerle HPV 3, 10 ve 28; endofitik, punktat ve küçük lezyonlarla HPV 4; ilerleyici ve kırmızı lezyonlarla HPV7'nin ilişkili olduğu bulunmuştur [90].

Deri siğilleri (basit siğiller) sıklıkla el ve ayaklarda olmak üzere vücutta herhangi bir bölgede özellikle açık ve travmaya maruz kalan alanlarda, tek veya multipl lezyonlar halinde ortaya çıkabilir. Bu yaygın siğiller "verruka vulgaris" olarak isimlendirilir. Sıklıkla HPV tip 1, 2, 3 ve 4 tarafından oluşturulur

ancak immün süprese kişilerde HPV tip 75 ve 77 de etyolojide suçlanmaktadır[91].

Kasaplık gibi et ile uğraşılan meslekler el siğilleri için daha yüksek riske sahiptir (en sık HPV tip 7 ile ilişkili). Herhangi bir yaşta deri siğili görülme oranı %10 iken, okul çağı döneminde bu oran %20'lere ulaşabilmekte ve ergenlik çağında en yüksek oranlara ulaşmaktadır. Bazı siğiller kendiliğinden kaybolur; ancak çoğu kozmetik sebeplerden dolayı tedavi edilir. Buna karşılık önemli bir oranı tedavinin tipine bakmaksızın tekrarlama eğilimindedir [92].

"Verruka plana" yani "düz siğiller" sıklıkla el sırtı, yüz ve bacakta, gruplar halinde bulunan, düzgün yüzeyli papüller şeklindedir. Genelde çocuk ve genç kızlar arasında gözlenir; deriden hafif yüksek, deriyle aynı renkte nadir olarak açık kahverengi olabilen lezyonlardır. Bu siğiller en çok HPV tip 3 ve 10, daha az oranda HPV tip 26, 29 ve 41 ile ilişkilidir [91].

"Verruka plantaris" yani "plantar siğiller" sıklıkla ayak tabanında tek bir lezyon olarak ortaya çıkar. Genelde 10-14 yaş arasında görülür; beş yaş altında nadirdir. Bunlar sıklıkla HPV tip 1 ve 4 ile, daha az sıklıkla da HPV tip 57, 60, 63, 65, 66 ile ilişkili olabilmektedir. Cilt yüzeyinden yukarıya yükselmezler ve ayak tabanının derinine doğru ilerleyen lezyonlar olduğu için genellikle ağrılıdır. Yüzme havuzlarında çıplak ayakla yapılan aktivitelerde, çevreye saçılan enfekte keratinositler vasıtasıyla bulaş riski olabilmektedir. Genelde tedaviye iyi cevap verirler [91].

HPV enfeksiyonu, immün sistemi sağlıklı bireylerde genellikle herhangi bir sağlık sorununa neden olmadan, kendiliğinden temizlenir. Subklinik HPV enfeksiyonlarının yaklaşık %70'i 1-2 yıl içinde kendiliğinden vücuttan temizlenmektedir [89].

Epidermodysplasia Verruciformis

İlk olarak 1922'de Lewandosky ve Lutz tarafından tanımlanan nadir görülen genetik kutanöz HPV enfeksiyonudur [93]. Kalıtım çoğunlukla otozomal resesiftir; ancak bazı olgularda otozomal baskın geçiş veya sporadik mutasyonlar da bildirilmiştir. Hastaların çoğunluğunda homozigot çerçeve

kayması ya da kromozom 17'nin uzun kolunda EVER1 ve EVER2 genlerinde mutasyon saptanmaktadır. Bu genler intraselüler çinko homeostazisinin korunmasında etkili transmembran proteinlerini kodlar.

Epidermodysplasia Verruciformis'te (EV) görülen deri lezyonları genellikle multiple düz siğiller, pitriyazis versikolor benzeri kırmızı-kahverengi maküller ve seboreik keratozu andıran lezyonlar şeklindedir. Genellikle çocukluk çağında görülür ve boyun, gövde, ekstremiteler ve yüzde lokalize olma eğilimindedir [91,94].

Lezyonlar genel olarak iki farklı formda ortaya çıkabilir ve aynı hastada farklı formlar birlikte görülebilir. Lezyonların bazıları düz siğiller şeklindedir; en sık HPV tip 3 ve 10 ile ilişkilidir. Diğer lezyonlar ise pullu yapıdaki siğiller veya kırmızı-kahverengi maküller şeklinde gözlenebilir. EV ile ilişkili HPV tipleri 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 25, 36, 38, 47 ve 50'dir. Pullu yapıdaki siğiller EV'ye özgü HPV tipleri ile ilişkili olup etyolojide en sık HPV tip 5 ve 8 suçlanmaktadır [93].

Epidermodysplasia Verruciformis'li vakaların yaklaşık yarısında, sıklıkla güneşe maruz kalan cilt bölgelerinde Bowen tipi karsinoma in situ ve invaziv skuamöz hücreli karsinoma gelişebilir. Malign dönüşümle en çok ilişkili olan tipler HPV 5 ve 8'dir [28]. Son yıllarda EV, hücresel bağışıklık defekti olan HIV, Hodgkin hastalığı, sistemik lupus eritematozus (SLE), organ transplantasyonu ve IgM eksikliği olan hastalarda daha sıklıkta gözlenmektedir [91,94].

2.1.7.2. Mukozal Siğiller

Erkek ve kadın genital sistemleri, solunum sistemi mukozası, oral mukoza ve konjunktiva HPV'nin enfektif etkisine en duyarlı olan bölgelerdir.

Oral kavitenin en sık görülen benign epitelyal tümörü oral papillomlardır ve her yaş grubunda görülebilir. Yüzeyleri düzensiz papüler görünümdeki bu lezyonlar cerrahi eksizyon sonrası nadiren tekrar oluşur [35].

2.1.7.2.1- Anogenital Siğiller

HPV cinsel yolla bulaşan yaygın viral enfeksiyonlardan biridir. Anogenital siğiller klinik olarak cinsel aktif popülasyonun en az %1'inde görülmekte ve yaklaşık üçte ikisi enfekte partner ile cinsel ilişki sonucu gelişmektedir. Enfekte partnerden cinsel temas ile bulaş olasılığının yaklaşık %65 olduğu bilinmektedir. Kuluçka süresi tam olarak bilinmemekle birlikte 3 hafta ile 8 ay arasında değiştiği tahmin edilmektedir [95].

Anogenital siğiller; perianal bölge, vulva, vajen, serviks, anüs, penis, skrotum ve üretra gibi bölgelerde büyük, nemli ve saplı yumuşak papillomlar şeklinde karşımıza çıkar. Lezyonlar akuminatoz, papüler, yassı ve planar olmak üzere dört farklı tipte görülebilir. Dış genital siğiller 'kondiloma aküminata' olarak da bilinir. Nadiren büyüyürek, malign dönüşüm gösterebilen Buschke-Lowenstein tümörü (dev kondiloma akuminata) olarak isimlendirilen deri tümörüne dönüşebilir[95].

Servikste yerleşimli düz siğiller (flat wart) ise Condylama planum olarak isimlendirilmektedir. Vakaların yaklaşık yarısında birden fazla bölgede yerleşimli lezyonlar olarak karşımıza çıkar. Sıklıkla asemptomatik olsa da kaşıntı, yanma, vajinal akıntı, kanama, ağrılı cinsel ilişki gibi şikayetlere neden olabilirler. Genital siğillerin yaklaşık %90'ında etken düşük riskli tipler olarak bilinen HPV tip 6 ve 11'dir [96]. HPV infeksiyonu anogenital siğillere ilaveten deri siğilleri, laringeal papilloma ve oral papillomlara da neden olabilmektedir.

2.1.7.2.2- Vulva-Vaginal siğiller

Dış genital bölgedeki siğiller klasik olarak kondiloma akuminata olarak tanımlanır. Saplı ve sivri uçlu olanlar keratinotik siğiller; kalın, boynuza benzeyenler ise papüler, düz siğillerdir. Düz (flat) siğiller yaygın deri lezyonlarından sorumlu olabilirler ve sıklıkla servikste görülürler. Tipik olarak ekzotifik kondilomalar keratinize epitelyumda oluşur ve multiple lezyonlar birleşerek dev kondilomaları oluşturabilir [30].

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 vajinal akıntı

şikayetleriyle başvurabilir. Vulvo-vajinal kondilomalarda disparoni (ağrılı cinsel ilişki) görülebilir ve eğer siğil boyutları çok büyükse üretra, vajina ve/veya rektumda obstrüktif semptomlar oluşabilir [97]. Kadınlarda kondiloma akuminata ayırıcı tanısında mikroglandüler papillomatosiz, himen artıkları, molloskum kontagiosum, kondiloma lata, nevüs, displazi ve karsinoma yer almaktadır. Ayırıcı tanıda biyopsi gereklidir.

HIV ile enfekte, organ transplantasyonlu ve İmmün yetmezliği olan olgularda, ileri yaş ve otoimmün hastalığı olan kişilerde genital siğiller hızlı büyüyebilir, dev boyutlara ulaşabilir ve malign transformasyon daha yüksek oranda görülür. Sigara bağışıklık sistemini baskılandığından viral klirens daha zor ve yavaş olmakta ve nüks olasılığı artmaktadır. Sigara içenlerde sigara içmeyenlere kıyasla %27 oranında artmış genital siğil gelişme riski vardır. Ayrıca sigara içen hastalarda HPV prevalansı (%48,2) sigara içmeyenlere göre (%37,5) daha yüksek bulunmuştur[98].

Viral aktivite enfekte kişinin immün durumuna göre değişkenlik göstermektedir. Örneğin gebelikte gözlenen göreceli immün supresyon nedeniyle HPV'ye bağlı lezyonlarda artış görülebileceği bilinmektedir.

2.1.7.2.3- Perianal siğiller

Kadınlarda siğillerin en sık görüldüğü lokalizasyon vulvadır ancak tüm perianal bölgenin muayene edilmesi önemlidir. Çünkü kadınlarda vulva-vaginal ya da erkeklerde penil siğil (kondiloma) saptanan hastaların yaklaşık %25'inde aynı zamanda perianal siğil de mevcuttur[97].

Anal siğillerin perianal lokalizasyona uzanım riski yüksek iken, perianal kondilomalı hastaların çoğunda anal siğiller mevcut değildir. İnfeksiyonun anal bölgedeki sekresyonların birikimine bağlı oluştuğu düşünülmektedir. Tipik olarak pembe-kahverengi papüller ve nodüller şeklindedir. Perianal siğillerin cinsel partnere bulaşma riski yüksektir ve hızlı tedavi edilmelidir.

Siğiller tedavi edilmezse birleşerek daha büyük kitle şeklinde rektuma uzanma eğilimindedirler ve bu vakalarda cerrahi tedavi gerekir. Perianal siğiller

homoseksüel erkeklerde daha yaygındır ve bu kişiler HIV açısından da risk altındadırlar [99].

Anüste görülen kondiloma akuminata (KA) mukokutanöz kavşaktan geçip rektal mukozaya implante olabilir. Rektal KA nadir görülür, klinik belirti vermez ve bu nedenle sıklıkla tedaviye geç başlanmaktadır. Bununla birlikte, rektumun skuamöz hücreli karsinomunun %12,2'si rektal KA ile ilişkilidir ve bu da KA'nın kolorektal kanser için risk faktörlerinden biri olduğunu göstermektedir. Rektal KA'nın patogenezinde ya anal ilişki ile doğrudan enfeksiyonun yayılımı ya da genital veya perianal siğillerin rektuma yayılması şeklinde olduğu düşünülmektedir [100].

2.1.7.2.4- Penil siğiller

Penil kondilomlar özellikle glans penis, penil şaft ve prepisyumu tutar. Meatus ve üretra çok nadir tutulur ve tedavide büyük problem oluşturur. O'Brien ve arkadaşları penil kondiloması olan 26 hasta çalışmışlar ve lezyonların HPV 6, 11, 31 ve karakterize edilemeyen tiplerden oluştuğunu bulmuşlardır [101].

Nielson ve arkadaşları son 1 yıl içerisinde gelişen genital siğili olan ve penil girişim öyküsü olmayan 18–40 yaşları arasındaki 463 erkek hastayı incelemişlerdir. Bu hastalarda glans, penil şaft, skrotum, üretra, perianal bölge, anal kanal ve semenden HPV için örnekler alınmış ve 237'sinde (%51,2) en az bir onkojenik veya non-onkojenik HPV tipi, 66 hastada (%14,3) ise henüz sınıflandırılamamış HPV tipi pozitif bulmuştur. Prevalansı en yüksek HPV tip 16 bulunmuş, onkojenik HPV tipleri genital örneklerde (glans/corona, şaft ve skrotum) anal örneklere göre daha yüksek (%25,1'e %5) bulunmuştur. Erkeklerde HPV enfeksiyonunun tanısı için penil ve üretral bölgeden fırça ile örnek alma en uygun metod olarak bildirilmektedir[102].

2.1.7.2.5. Rekürren Respiratuvar Papillomatozis (RRP)

Rekürren respiratuvar papillomatozis (RRP) laringeal bölgeyi tutan iyi huylu bir epitelyal tümördür. Hem çocuklarda hem yetişkinlerde hastalık oluşturabilen, solunum yollarında skuamöz papillomlarla karakterize, kronik bir

hastalıktır. RRP klinik seyri değişkendir, çocukluk döneminde ilerleyici ses kısıklığının da en sık ikinci sebebidir. Ayrıca solunum yollarında tıkanıklığı neden olabildikleri için çocukluk çağında çok tehlikeli kabul edilir. RRP'ye HPV tip 6 ve 11'in neden olduğu gösterilmiştir. Tekrarlama ve yayılma eğilimleri vardır ayrıca malign transformasyon gösterebilir[103].

RRP'de bulaş yolu net değildir. Çocuklardaki enfeksiyonun genital HPV enfeksiyonu olan annenin doğum kanalından bulaştığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Yetişkinlerde ise oro-genital temas yoluyla bulaş olabileceği düşünülmektedir [104].

2.1.7.3. HPV ile ilişkili insan kanserleri

2.1.7.3.1. Serviks Kanseri

HPV epiteliotropik bir virüs olup tüm dünyada servikal kanserin primer etyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir. Amerikan Kanser Derneği 2007 yılında invaziv servikal kanserli 11150 yeni vakanın tespit edildiğini ve bunlardan 3670'inin aynı yıl içinde kaybedildiğini bildirmiştir. Ne yazık ki dünya genelinde servikal kanser tanısında hala ciddi eksiklikler mevcuttur, özellikle gelişmekte olan ülkelerde servikal kanser sebebiyle yılda en az 250 bin kişinin kaybedildiği tahmin edilmektedir [105].

Serviks kanseri genellikle endoservikal kanalın kolumnar epitelinin ektoserviksin stratifiye skuamöz epiteli ile yer değiştirdiği "servikal transformasyon zonu" olarak adlandırılan bölgeden köken almaktadır. HPV enfeksiyonlarının malign dönüşüme neden olduğu bölgeler serviks, orofarenks, anüs gibi farklı epitel bölgelerinde bulunan bu transformasyon (dönüşüm) bölgeleridir.

Servikal kanser gelişimi dört temel basamaktan oluşur; İlk basamak, yüksek riskli HPV ile servikal transformasyon bölgesindeki metaplastik epitelin enfeksiyonu, ikinci basamak HPV enfeksiyonunun devamlılık göstermesi (persistansı), üçüncü basamak, bir epitel hücresinin kalıcı HPV enfeksiyonundan maligniteye ilerleme göstermesidir. Dördüncü basamak ise bazal membrana invazyon ve karsinom gelişimidir [106].

Servikal kanserlerin yaklaşık %80'ini skuamöz hücreli karsinom (SCC) oluşturmaktadır. Kalan yaklaşık %20'lik kısmın çoğunluğunu adenokarsinomlar oluşturur ve glandüler epitelden köken alır. Yüksek riskli HPV'ler, tüm histolojik tipler için kuvvetli risk faktörüdür. HPV tip 16 ya da 18 servikal SCC'lerin %74'ünde, adenokarsinomların %78'inde pozitif olarak bulunmuştur. Sigara skuamöz hücreli karsinom için çok ciddi bir risk faktörü iken, adenokarsinom ile ilişkisi gösterilememiştir. Daha önce Pap smear testi yapılmış olması, serviks kanseri riskini azaltmaktadır (SCC riskinde azalma daha belirgindir) [107].

Servikal kanserin erken evresi olan mikroinvazyon ve displazi safhasında hastalar çoğunlukla asemptomatiktir. Bununla birlikte servikste kanser klinik olarak görülebilir hale geldiğinde en sık kötü kokulu vajinal akıntı ve/veya düzensiz vajinal kanama görülür ve bu şikayetler genellikle cinsel ilişki sonrasında ortaya çıkar. Diğer belirtiler arasında; ağrılı cinsel ilişki, postmenopozal kanama, pelvik bölgede ağrı, idrar yaparken ağrı, rektal kanama, hematüri, yorgunluk, iştahsızlık, kilo kaybı yer almaktadır [108].

Servikal kanser, prekanseröz lezyonların tespiti ve tedavisi ile büyük oranda önlenebilir bir hastalıktır. Erken tanı etkilidir çünkü prekanseröz lezyonlar invaziv kansere çok yavaş bir şekilde genellikle 10 yıldan uzun bir sürede ilerleme gösterir[109,110]. Servikal displazi için ortalama tanı yaşı 29 iken invaziv kanserde 47'dir [99]. Servikal kanser, skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL) veya servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) olarak tanımlanan prekanseröz lezyonlardan gelişir.

Servikal prekanseröz lezyonlarda sitolojik tarama testi olan Papanicolau (Pap smear) testi kullanılarak servikal hücrelerin analizi yapılır. Servikal kanser taramasında Pap smear ve HPV testleri aynı anda yapılabilmektedir. Anormal Pap smear testi serviks kanserli hastalarda en yaygın saptanan bulgudur[111].

İnvaziv servikal kanserden önce hücresel olgunlaşmada, stratifikasyonda bozukluklar ve nükleer atipi ile karakterize öncül lezyonlar meydana gelir. Bu öncül lezyonlar sitolojik olarak Bethesda terminolojisine göre skuamöz intraepitelyal lezyon (SIL) ve histolojik olarak da servikal intraepitelyal neoplazi

(CIN) şeklinde sınıflandırılmaktadır [13]. CIN sınıflandırmasında histolojik olarak lezyonlar; hafif displazi (CIN I), orta displazi (CIN II), şiddetli displazi (CIN III) olacak şekilde derecelendirilmiştir[112]. Skuamöz intraepitelyal lezyonlar, 2001 yılında son şeklini alan Bethesda sisteminde üç gruba ayrılmıştır;

Atipik skuamöz intraepitelyal lezyonlar (ASC)

- Önemi saptanamayan atipik skuamöz hücreler (ASC-US)
- Yüksek dereceli lezyon dışlanamayan atipik skuamöz hücreler (ASCH)

Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (HSIL)

- Orta ve şiddetli displazi, in-situ karsinom, CIN II ve CIN III

Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (LSIL)

- Hafif displazi, HPV ve CIN I

2.1.7.3.2. Anal Kanserler

Anal kanserler oldukça nadir görülür ancak son yıllarda yapılan araştırmalar insidansın artmakta olduğunu göstermektedir[105]. Anal kanserlerin etyolojisinde hemoroid, fissür, inflamatuar barsak hastalıkları gibi kronik lokal inflamasyonun etkili olduğu düşünülmektedir.

Güncel çalışmalar HPV enfeksiyonu, özellikle birden fazla HPV genotipi ile olan enfeksiyonlar, servikal displazi veya kanser, HIV pozitifliği, düşük CD4 düzeyi, sigara kullanımı, anal ilişki ve solid organ transplantasyonu gibi immün supresyon durumlarının da risk faktörleri arasında olduğunu göstermektedir [113]. Anal kanalda HPV alt tiplerinin oluşturduğu klinik spektrum servikal tutuluma benzerdir. HPV 16 anal kanserlerde en sık saptanan tiptir. Palefsky ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HPV 16'nın özellikle yüksek dereceli anal intraepitelyal lezyon (AIN) ve invaziv kanserle ilişkili olduğunu bulmuştur[114]. HPV tip 6 ve 11 ise kondiloma ve düşük dereceli AIN ile ilişkilidir. Anal örneklerde yaygın olarak izole edilen, servikal örneklerde nadiren bildirilen HPV alt tipleri ise 53, 58, 61 ve 70'tir.

Anüste görülen kondiloma akuminata'nın (KA) nadiren mukokutanoz kavşaktan geçerek rektal mukozaya invaze olabileceği unutulmamalıdır. Rektumun skuamöz hücreli karsinomunun (SCC) %12,2'si rektal KA ile ilişkilidir ve bu da KA'nın kolorektal kanser için risk faktörlerinden biri olduğunu göstermektedir. Rektal KA nadir olarak görülür, pek belirti vermez ve bu nedenle sıklıkla tedaviye geç başlanmaktadır Rektal KA'nın patogenezinde ya anal ilişki ile doğrudan enfeksiyonun bu bölgede ortaya çıkması ya da genital veya perianal siğillerin rektuma yayılması şeklinde olmaktadır[100].

Erken evre anal kanserler genelde asemptomatiktir. Hastalar rektal kanama, akıntı, anal kaşıntı ve şişlik hissi, ağrı, daha sık veya seyrek dışkılama, dışkının incelmesi gibi belirtilerle başvurabilir. Eğer rektal kanama hemoroide bağlanıp yeterli tetkik edilmezse tanıda gecikmeler olabilir. Bu yüzden rektal tuşe erken tanı için önem taşımaktadır [115].

2.1.7.3.3- Vaginal, Vulvar ve Penis Kanserleri

Tüm dünyadaki kanserlerin yaklaşık %5'inin etkeni HPV'dir[19]. Dünya genelinde kadın kanserlerinin %9,4'ünün (serviks %100, anüs %88, vajina %70, vulva %43, orofarenks %26), erkek kanserlerinin %6'sının (anüs %85, penis %50, orofarenks %26) etyolojisinde HPV suçlanmaktadır [116].

Persistan genital siğillerden (HPV tip 6, 11) penis ve vulvada nadiren verrüköz karsinom gelişimi görülebilmektedir. Buschke-Lowenstein tümörü (BLT) olarak da adlandırılan dev condyloma accuminata düşük dereceli, penis dahil olmak üzere dış genital bölgeyi kaplayan skuamöz hücreli karsinoma çeşitidir. Genellikle 5.dekattan sonra ortaya çıkar ve erkeklerde yaklaşık 3 kat daha sık görülmektedir. Tüm BLT vakaların %30-56'sında malign transformasyon bildirilmiştir ve cerrahi eksizyon sonrası 10 ay içerisinde nüks riski %60-66 arasında değişmektedir. Uzak metastaz genellikle olmaz ve ölüm oranı beş yılda %20-30'dur. Genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda izlenmektedir.

Vulvar skuamöz hücreli karsinomlar 50 yaş altı kadınlarda daha sık görülmekte ve çoğunda HPV DNA pozitif saptanmaktadır. Vulvar, vajinal ve

penil kanserlerde en sık HPV tip 16 saptanır ve bunu HPV tip 18, 31 ve 33 izlemektedir [117,18]. Vulvar ve penil karsinomlarda prognoz genellikle HPV DNA pozitif olanlarda negatif olanlara göre daha iyi seyretmektedir.

2.1.7.3.4- Baş Boyun Kanserleri

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomları oral kavite, orofarenks, nazofarenks, larenks ve hipofarenkste görülmektedir. Bunların %23-35'i HPV ile ilişkili bulunmuştur. En sık (%68-87) HPV tip 16 olmak üzere, daha az sıklıkla HPV tip18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarında esas risk faktörleri alkol ve sigara kullanımıdır [118]. Onkojenik HPV tipleri saptanan hastalarda orofarenks ve oral kavite kanseri gelişme riski 2-4 kat artmıştır. Son yıllardaki çalışmalarda tütün kullanımında azalmaya rağmen orofarengeal kanserlerde artış görülmesi dil tabanında ve tonsillerde tespit edilen HPV ile ilişkili bulunmuştur. HPV maruziyetinden yaklaşık 10 yıl sonra orofarengeal kanser geliştiği düşünülmektedir[119].

HPV ile ilişkisi ortaya konmuş olan bu maligniteler dışında prostat, mesane kanseri, renal ve testiküler kanserler ve meme kanseri gibi diğer solid organ kanserleri ile HPV enfeksiyonları arasındaki ilişki henüz net değildir. Bu alanlarda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.1.8- HPV Tanı Yöntemleri

Klinik hastalık evresine ilerlemiş HPV enfeksiyonlarının tanısı, mevcut lezyonların görsel muayenesi ve enfeksiyona ait belirtilerin varlığıyla konulabilirken, subklinik veya latent HPV enfeksiyonları rutin muayeneler sırasında yapılan Pap yayması incelemeleriyle tespit edilebilmektedir. Klinik görünüm tanı için yeterli olmakla birlikte tanı kesin değilse, tedavi sırasında kötüleşme veya tedaviye direnç varsa, lezyon atipik ise (pigmente, endure, kanamalı, ülsere siğiller gibi) biyopsi alınmalı ve genital siğil tanısı doğrulanmalıdır.

Bu aşamada yapılan sitolojik inceleme ve moleküler yöntemlerle doku veya hücrelerde viral nükleik asitlerin gösterilmesiyle tanı doğrulanmış olur[120]. HPV

standart hücre kültürlerinde üretilemez. Serolojik testler yeterince duyarlı değildir bu yüzden tanıdaki yeri kısıtlıdır. Virüsün replikasyonu epitel hücresi içinde tamamlandığı için genelde saptanabilen bir viremi tablosu yoktur ve hücre yıkımı olmadığından virüse karşı güçlü bir İmmün yanıt gelişmez. Skuamöz epitelden serbestleşen viral partiküller çok düşük bir oranda kapiller damarlara ve lenfatik sisteme geçerek lenf nodlarına taşınır ve burada immün cevabı kısmen başlatabilir. Oluşan immün yanıt majör kapsid proteinlerine (L1 antijeni) karşı gelişir ve bu antikorlar uzun yıllar saptanabildiği için serolojik testler akut ve geçirilmiş enfeksiyonu ayırt edemez [121].

Enfekte hücrelerde viral kapsid antijenlerinin saptanması, Bovine papillomavirus (BPV)'un geç proteinlerine karşı oluşturulan antikorların kullanılmasıyla olabilmektedir. Ancak yalnızca prodüktif enfeksiyon varlığında tanı koydurucudur ve HPV tiplerinin ayrımı yapılamadığından risk belirlenmesinde duyarlılıkları düşüktür[71,122].

HPV erken proteinlerinin saptanması ise enfekte hücrelerdeki protein ekspresyonu düzeylerinin düşük olması nedeniyle zordur. Bunun için E6 ya da E7 proteinlerine karşı oluşturulan antikorlar kullanılabilir. Fakat immunohistokimyasal yöntemlerle protein ekstratlarında direkt olarak antikorların görüntülendiği testlerin kullanımı henüz in vitro deneylerle sınırlıdır[122]. HPV'nin kesin tanısı moleküler yöntemler kullanılarak HPV-DNA'nın doğrudan saptanması ile konulabilmektedir.

2.1.8.1. Fizik Muayene ile Tanı

Doğrudan gözle yapılan fizik bakıda asetik asit veya lugol-iyot çözeltisi kullanılarak serviksin yeterli ışık altında incelenmesi esastır. HPV'ye bağlı gelişen kanser öncülü veya kanser lezyonlarında asetik asit uygulaması sonrası epitelin beyazlaşması ile "asetowhite" görünümü veya lugol uygulaması sonrası kısmen veya hiç boyanmaması klinik açıdan anlamlı kabul edilir[123].

2.1.8.2. Sitopatolojik tanı

Günümüzde HPV enfeksiyonlarında tarama amacıyla serviko-vajinal hücrelerde Papanicolau boyası kullanılarak mikroskopik olarak HPV'ye bağlı sitopatolojik değişikliklerin saptanması esas alınmaktadır[88]. Kısaca Pap smear testi olarak adlandırılan bu yöntem kanser taramasında çok değerli olmakla birlikte duyarlılığı düşüktür ve yanlış negatif sonuç verme olasılığı yüksektir (duyarlılık %53-55, özgüllük %96-97) [124]. Bu test nükleer atipi, gecikmiş maturasyon, hiperkeratozis, parakeratozis ve yüksek dereceli sitolojik değişiklikleri göstererek serviks kanserinde erken tanı olanağı sağlamaktadır. Pap smear sonucu anormal olan hastalarda, onkojenik potansiyeli açısından HPV tipinin belirlenmesi gereklidir. Bu amaçla yüksek riskli HPV tiplerinin varlığı araştırılır; düşük riskli tipler taranmaz [125].

Ülkemizde 1992 yılından itibaren Ulusal Kanser Tarama Programı kapsamında rutin olarak Pap smear ile sitolojik inceleme yapılmaya başlanmıştır. HPV DNA testi de 2014 yılında tarama programımıza eklenmiştir[126].

Tanıda kullanılan sitopatolojik yöntemler, özgül ve özgül olmayan testler olmak üzere iki gruba ayrılır. Yayma ve biyopsi örneklerinin patolojik incelemeleri sık başvurulan özgül olmayan tanı yöntemleridir. Konvansiyonel sitolojinin serviks kanserini saptama duyarlılığı %70-80 aralığında iken, yeni geliştirilen sıvı bazlı teknolojilerle bu oran %85-95'lere kadar yükselmiştir [127].

Özgün probların kullanıldığı moleküler temelli bir yöntem olan in-situ hibridizasyon özgül tanı yöntemlerine örnek olarak verilebilir. Hücre içi HPV-DNA ile hibridize olan probların kullanıldığı bu yöntem, sitopatolojik incelemeleri tamamlayıcı niteliktedir; ancak özel amaçlar dışında yaygın kullanımı yoktur. Birden fazla tipe özgül probun kullanılmasını gerektiren bu yöntem düşük duyarlılığa sahip olmasına rağmen, enfeksiyonun lokalizasyonunu belirleyebildiği için özel bir öneme sahiptir [127].

HR-HPV enfeksiyonlarında, p53 ve retinoblastoma (pRb) proteinlerinin inaktive olmasıyla ekspresyonu artan p16 protein düzeylerinin immün histokimyasal yolla ölçümünün de tanı ve klinik değerlendirmeler için faydalı olabileceği bildirilmiştir[19]. 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.

2.1.8.3- Mikrobiyolojik Tanı

Enfeksiyöz HPV partikülleri standart in vitro kültür sistemlerinde üretilemezken, sadece ksenograft veya organotipik raft kültürleri gibi özel ortamlarda üretilebilmektedir. Ancak uygulaması zor olan bu yaklaşımlar, rutin virolojik tanıdan ziyade aşı geliştirme programları ve araştırma amaçlı kullanılmaktadır [127].

Teknolojinin gelişmesiyle virus benzeri partiküllerin üretilmesi enfeksiyonların tanısında HPV L1 kapsid proteinine karşı oluşan antikorların ölçülebildiği serolojik testlerin geliştirilmesine öncülük etmiştir [128]. Hatta, yeni geliştirilen yöntemler ile belirli HPV tiplerine karşı oluşan özgül antikor yanıtları da ölçülebilmektedir.

Enfeksiyonun geçirilmesinden uzun süre sonra bile (HPV-DNA varlığı saptanamadığı halde) antikor varlığının saptanabilir düzeyde olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte bir grup hastada HPV kaynaklı antikorların (IgA, IgG) titreleri düşüktür ve serokonversiyon enfeksiyondan aylar hatta yıllar sonra meydana gelebilir. Bazı hastalarda antikor yanıtı asla tespit edilemez çünkü enfeksiyonun epitelyal doku ile sınırlı olması nedeniyle, HPV-DNA pozitif kadınların önemli bir bölümünde (%30-50) serokonversiyon oluşmayabilir. Ayrıca saptanan antikorların sonraki enfeksiyonlara karşı koruma sağlayıp sağlamayacağı ve doğal bağışıklığın yaşam boyunca devam edip etmeyeceği de bilinmemektedir [129].

Bazı hastalarda E6 ve E7 onkoproteinlerini eksprese ettikleri halde serolojik yanıt gelişmeyebildiği ya da aksine herhangi bir malign enfeksiyon söz konusu olmadığı halde belirli tiplerle oluşan cilt enfeksiyonlarında antikor varlığı saptanabilmektedir.

Serolojik yöntemlerin aktif ve geçirilmiş enfeksiyonları ayırt edememelerinin yanı sıra enfeksiyon tamamen temizlendiği halde antikor testlerinin pozitif

olması da bir diğer problemdir. Tüm bu nedenler serolojik testlerin HPV enfeksiyonlarının tanısında kullanılmasına veya hastalık seyrinde bir prediktif belirteç olarak değerlendirilmesine engel olmaktadır [128,130].

Sonuç olarak virüsün rutin hücre kültürü ortamlarında üretilememesi, serolojik testlerin sınırlılıkları, elektron mikroskopi ve immünohistokimyal yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin düşük olması gibi nedenlerden dolayı, HPV enfeksiyonlarının rutin mikrobiyolojik tanısı için önerilen temel tanı yöntemi viral nükleik asitlerin tespitine dayanmaktadır [128].

2.1.8.4-Moleküler Tanı Yöntemler

HPV in vitro kültürü yapılamayan, küçük, çift sarmallı bir DNA virüsüdür; bu nedenle varlığını tespit etmek için çeşitli ek testler geliştirilmiştir. Başlıca tanı yöntemleri arasında sitolojiyle sitomorfolojik değerlendirme ve çeşitli moleküler analizlerle viral DNA'nın tespit edilmesi yer almaktadır. HPV enfeksiyonunun kesin tanısında viral nükleik asitin saptanması, yani HPV DNA'nın doğrudan tespiti gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan moleküler tanı testleri üç başlıkta incelenebilir[128].

1. Direkt hibridizasyon yöntemleri

2. Sinyal amplifikasyon yöntemleri

3. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri

2.1.8.4.1- Direkt Hibridizasyon Yöntemleri

Direkt hibridizasyon yöntemleri ilk HPV çalışmalarında kullanılmıştır. Bu prob testleri temel olarak; In-Situ Hibridizasyon (ISH), Southern Blot Hibridizasyon (SBH), Dot-Blot Hibridizasyon (DBH) ve Floresans İn Situ Hibridizasyon (FISH) olarak gruplandırılabilir[131]. Bununla birlikte örnek toplama, saklama veya işlem sırasında hedef nükleik asit kaybı teknik için önemli sınırlayıcı faktörlerdir. Bu yaklaşımlar genel olarak iyi kalitede bilgi sağlamasına karşın prosedürlerin zaman alıcı olması, düşük duyarlılık, saflaştırılmış DNA ihtiyacının fazla olması gibi dezavantajlara da sahiptir [132].

SBH testinde ilk olarak işleme alınan DNA'nın izolasyonu ve kesimi gerçekleştirilir. Bu DNA parçaları uzunluklarına göre agaroz jelde ayrıldıktan sonra naylon veya nitrosellüloz membrana aktarılarak özgül DNA dizilerinin yeri, işaretlenmiş genomik HPV probları vasıtasıyla belirlenir. Bu yöntem hücre genomuna integre olmuş veya epizomal haldeki DNA'nın ayrımını yapabilmekte ve hücredeki viral kopya sayısını saptayabilmektedir. Bu avantajlarıyla yıllarca altın standart yöntem olarak uygulanmıştır; ancak zahmetli ve zaman alıcı olması, çok sayıda numune çalışılmasına uygun olmaması nedeniyle rutin kullanım için uygun değildir ve çoğunlukla araştırma amaçlı kullanılır. Teorik olarak özgüllüğünün yüksek olmasına karşın duyarlılığı PCR'a göre daha düşüktür [131,133].

DBH testi, SBH yöntemine göre daha kolay, fakat duyarlılığı düşüktür. Çalışma prensipleri benzerdir; ancak elde edilen DNA elektroforez olmadan destek membrana aktarılır ve burada sabitlendikten sonra özgül diziler belirlenir. Çalışılan örnekte DNA miktarının fazla olması gerekmektedir. Günümüzde iki ticari test (Virarap® ve Viratype®) bulunmaktadır [134].

İn situ hibridizasyon (ISH) testi hem parafine gömülü doku örneklerinde hem de servikal yaymalarda HPV antijenlerinin veya nükleik asitin (DNA veya mRNA) spesifik problar ile birleşmesi temeline dayanmaktadır. Rutin olarak biyotinlenmiş problar kromojenik substratlar ile tespit edilir ve yöntem klinik kullanımlar için otomatize edilmiştir. Bu amaçla klinik kullanımda mevcut olan ticari test The Ventana INFORM HPV testidir (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).

ISH testi ile viral HPV'nin enfekte hücredeki lokalizasyonu belirlenebilir; virüsün epizomal halde veya hücre genomuna entegre olup olmadığı saptanabilir. Ancak zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Yüksek riskli HPV (hrHPV)'ler için kromojenik bir tarama yöntemidir. Floresan probların veya minik nanoprobların kullanılması, sinyal amplifikasyonu ayrıca bu tekniklerin kombine edilmesiyle de duyarlılıkta artış sağlanmıştır [135,131]. Hibridizasyon testleri PCR ile kıyaslandığında sensitivitesi çok düşüktür. Bu testler genellikle araştırma amacıyla kullanılır çalışılması yorucu ve zaman alıcıdır. Fazla sayıda

örneğin incelenmesi için uygun değildir o yüzden rutin uygulamada tercih edilmez[128,135].

2.1.8.4.2- Sinyal Amplifikasyon Yöntemleri

Sinyal amplifikasyon sistemlerinde nükleik asitler ilk olarak özgün problarla hibridize edilir ve daha sonra bu komplekslerden üretilen sinyallerin derecesi artırılır. Hybrid Capture (HC) 1 ve 2 (Digene, ABD), NextGen (Qiagen, Almanya) ve Invader ASRs (Hologic, ABD) HPV tanısında kullanılan ve sinyal amplifikasyonu prensibi ile çalışan ticari testlerdir. 2003 yılında FDA'dan Qiagen STM (Standard Transport Media) ve ThinPrep Pap Test PreservCyt Solution (Hologic, Marlborough, ABD) ile kullanılmak üzere onay alan Hybrid Capture 2 (HC2) testidir[136]. Bu yöntemde 13 yüksek riskli (tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) ve 5 düşük riskli HPV-DNA (tip 6, 11, 42, 43, 44) hedefleriyle reaksiyona giren RNA probları kullanılır.

L1 gen bölgesini hedefleyen HPV DNA'sı ile komplementer RNA prob karışımları solüsyon içinde hibridize olmaktadır. Oluşan DNA-RNA hibridleri özgül antikorlarla kaplı mikroplaklara aktarılır ve bu antikorlar tarafından yakalanan hibridler, alkalen fosfataz ilavesiyle konjuge hibrid antikorlarına bağlanır. Yakalanmış durumdaki her hibrid moleküle çok sayıda antikor bağlanabildiği için hedef virüs başına yaklaşık 3000 kat göreceli sinyal amplifikasyonu sağlanır. Daha sonra alkalen fosfataz enzimi ile reaksiyona giren kemiluminesan substrat ilave edilir ve açığa çıkan ışık işaretli antikorlar yardımıyla tanınır. Bir dizi reaksiyondan sonra luminometre tarafından üretilen sinyaller görece ışık birimleri (RLU) olarak okunur ve viral yük semi-kantitatif olarak tespit edilir. Bu şekilde yöntem, numunedeki HPV tipinin yüksek veya düşük risk grubunda olduğu bilgisini verir; fakat spesifik HPV tipini tanımlamamaktadır [134].

HC2 yöntemi, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) yöntemine benzer şekilde 96 kuyucuklu mikroplak formatındadır ve klinik laboratuvarlarda oldukça sık uygulanmaktadır [139].

Sinyal amplifikasyon testlerinin en önemli avantajları standardize edilmiş ve kolay uygulanabilir olmalarıdır. Bununla beraber, genotip düzeyinde tanımlama yapma ve çoklu enfeksiyonları tespit etme etkinlikleri sınırlıdır; ayrıca saptama limitlerinin de nispeten yüksek olması (tespit sınırı yaklaşık 5000 genoma eşdeğer) başlıca dezavantajlarıdır. Aynı zamanda prob karışımı içeriğinde olmayan HPV tipleri 53, 66, 67 ve 73 ile çapraz reaksiyona girmesi de yöntemin diğer bir önemli dezavantajıdır[137,138].

Bir diğer sinyal amplifikasyon sistemi olan *Invader ASRs* yönteminde, L1 dışındaki gen bölgeleri de hedeflenmektedir. HPV'nin 14 yüksek riskli tipini saptayan yöntem üç farklı prob kokteyli içerir. Testin çalışma prensibi HC2 sisteminden farklıdır. Tipe özgül hibridizasyonu takiben cleavase enzimi ile parçalanan problardan floresans oluşması prensibi ile çalışan kalitatif bir yöntemdir. Bu teknoloji ile çalışan *Cervista HPV HR* ve *Cervista HPV 16/18* (Hologic, ABD) olmak üzere iki farklı ticari test geliştirilmiştir.

Cervista® HPV HR Test, 2009'da FDA tarafından 30 yaş altı kadınlarda servikal sitolojiyle beraber değerlendirme ve ASCUS'lu kadınlarda kolposkopi ihtiyacı olup olmadığının saptanması amacıyla kullanım onayı almıştır. Bu test 14 yüksek riskli HPV tipini (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,66, 68) saptamaktadır. HC2 testi ile karşılaştırıldığında duyarlılığının CIN II'lerin saptanmasında %98, CIN III'lerin saptanmasında %100 olduğu gösterilmiştir. Bu testin yanlış pozitif sonuçlarının düşük olduğu, ayrıca HPV 16 ve 18'in tespit edilmesinde özgüllük ve duyarlılığın yüksek olduğu gösterilmiştir[139]. Cervista HPV 16/18 yöntemi yüksek riskli bir tip olan HPV-31 ile yüksek düzeyde çapraz reaktivite gösterir ve düşük viral kopya sayılı enfeksiyonlarda yanlış negatif sonuçlar elde edilebilmektedir.

2.1.8.4.3- Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri

PCR temelli tanı testleri, HPV tanısı için en yaygın kullanılan ve en sensitif testlerdir. Nükleik asit amplifikasyon sistemlerinde nükleik asitler ilk olarak özgün problarla hibridize edilir ve daha sonra bu komplekslerden üretilen sinyallerin derecesi artırılır[138]. Hedef DNA dizisi 1 saat içerisinde yaklaşık 1 milyon kez çoğaltılabilir.

Bu testlerin en önemli avantajları kolay uygulanabilirlikleri ve standardize edilmiş olmalarıdır. Ayrıca PCR ile az miktarda numune çalışılabilmekte ve viral yükün çok düşük olduğu durumlarda bile sonuç alınabilmektedir.

Viral genomdaki hedef gen bölgelerinin çoğaltılması temeline dayanan bir yöntemde ilk olarak hedef DNA denatüre edilir ve ortaya çıkan tek DNA zinciri kalıp olarak kullanılır. *Taq* DNA polimeraz enzimi aracılığıyla, çoğaltılmak istenilen gen bölgesine özgül oligonükleotid primerleri kalıp zincire bağlanarak çift zincirli DNA moleküllerini meydana getirilir. Her yeni sentezlenen çift zincirli DNA molekülü bir sonraki siklusta kalıp DNA zinciri olarak görev almaktadır[137,140].

PCR testlerinin saptama duyarlılığı genel olarak 100 ng hücresel DNA içeren bir klinik örnekte 1-100 viral genomdur. Ancak, PCR tabanlı yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü, DNA ekstraksiyon prosedürleri, klinik örneğin tipi ve yeri, örnek taşıma ve saklama şekli, primer setleri, PCR ürününün büyüklüğü, reaksiyon koşulları ve reaksiyonda kullanılan DNA polimerazın performansı gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir[141].

Klasik PCR temelli sistemler çoğunlukla ikinci bir saptama ve tiplendirme tekniği içerirler. Ancak günümüzde yaygın olarak kullanılan gerçek zamanlı PCR uygulamaları ile HPV-DNA'nın saptanması, tip tayini ve kantitatif analizler tek basamakta gerçekleştirilebilmektedir[128]. Klinik örneklerde HPV-DNA varlığı aynı anda çok sayıda farklı HPV tipini saptayabilecek şekilde tasarlanan genel primerlerin kullanıldığı geniş spektrumlu PCR analizleri veya tipe özgül primerlerin kullanıldığı PCR analizleri ile araştırılabilir[128].

Gerçek zamanlı (real time-RT) PCR testlerinde amplifikasyon ürünleri SYBR Green gibi özgül olmayan boyalar kullanılarak veya farklı floresan boyalarla işaretlenmiş tipe özgül problar kullanılarak görüntülenebilir. Bu iki yaklaşımın dışında, HPV enfeksiyonlarının tanısında kullanılmak üzere maliyeti ve iş yükünü azaltmayı hedefleyen multipleks PCR testleri ve saptama duyarlılığını artırmayı amaçlayan nested PCR uygulamaları gibi PCR temelli farklı yöntemler de tanımlanmıştır [142,143].

RT-PCR testlerinin en önemli avantajları çok düşük konsantrasyonlardaki nükleik asitleri saptayabilmeleri, kantitatif sonuç elde edilebilmesi, tekrarlanabilirliklerinin yüksek olması ve test sonuçlarının kısa sürede alınabilmesi olarak sıralanabilir. Bu grup testlerin gelişmiş bir örneği olan Cobas 4800 HPV Test (Roche, ABD) ticari bir test olarak kullanımda olup tek bir analizde 14 HR-HPV tipini saptayabilmektedir. Test HPV-16 ve 18'i özgül olarak tanımlarken, eşzamanlı olarak diğer 12 HR-HPV tipini de saptamaktadır[144].

2.1.8.4.3.1- Tip Spesifik PCR Testleri

PCR yönteminin, tip spesifik ve konsensus testler olmak üzere 2 ana tipi vardır. Tipe özgül PCR testinde tek bir HPV tipinin amplifikasyonu gerçekleştirilir. Her hasta örneği için birden fazla PCR yapılması gerektiğinden, hem tanı için gereken süre uzamakta hem de maliyet artmaktadır. Tipe özgül PCR testleri tekli ve çoklu enfeksiyonlarda veya düşük kopya sayılı örneklerde yüksek duyarlılıklı veriler sunmaktadır. Bu nedenle enfeksiyon etkeni olan HPV tipinin kanseröz dönüşümde iyi tanımlanmış bir risk faktörü olması nedeniyle önem taşımaktadır. Buna karşın konsensus PCR testleri tek PCR çalışması sonucunda birçok HPV tipinin tespit edilmesine olanak sağlar.

2.1.8.4.3.2- Konsensus (genel) PCR Testleri

Konsensus testler HPV tiplerinin büyük bir kısmının tanınmasına olanak sağlar. Genel primerler HPV genotiplerinin geniş bir grubunu hedefleyerek klinik örneklerde tek reaksiyonda en fazla sayıda HPV tipini amplifiye edebilecek şekilde tasarlanmıştır. En çok tercih edilen genel ya da konsensus PCR için primerler, HPV genomunda iyi korunan bölge olan L1 gen bölgesini hedeflemektedir ve HPV tiplerinin klasifikasyonu için kullanılır.

Çok sayıda HPV tiplerinin saptanmasında kullanılan konsensus primer sistemleri çeşitlidir. Neredeyse tüm mukozal HPV genotipleri bu primerlerle saptanabilmektedir. E1 gen bölgesini hedef alan birkaç genel primer de tariflenmiş, ancak klinik kullanımda henüz yaygınlaşmamıştır[131,145].

HPV DNA saptanmasında en yaygın kullanılan konsensus primer setleri, L1 gen bölgesini hedef alan; MY09/11 ve modifiye edilmiş şekli PGMY09/MY11, GP5/GP6 ve daha uzun şekli GP5+/GP6+ ve SFP'dir. PGMY09/11 primerleri MY09/11 ile aynı primer bağlanma bölgelerini kullanan, sensitivitesi ve çoğalabilirliği geliştirilmiş primerlerdir [145]. MY09/MY11 ve PGMY09/11 primer seti kullanılarak L1 bölgesinin 450 baz çiftlik (bç) bölgesi, GP5/GP6 primerleri ile 150 bç ve SFP primerleri ile 65 bç'lik bölgesi hedeflenerek çoğaltılabilir [128].

Bazı araştırmacılar viral integrasyon sırasında L1 bölgesinin kaybolabildiği veya parçalanabildiğini ve böylece yanlış negatif sonuçların ortaya çıkabileceğini, ancak E6 ve E7 onkoproteinlerinin salınımının devam ettiğini bildirmişlerdir[146]. E6 ve E7 bölgelerini hedefleyen primer setleri de günümüzde kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada yüksek riskli HPV tiplerinin (19 tip) geniş bir kısmını tanımak için 31 primer içeren E7 primer havuzu oluşturulmuştur. Eğer L1 ve E6/E7 yöntemleri birlikte kullanılırsa testin sensitivitesi arttırılırken, yanlış negatiflik oranları da azaltılmış olacaktır[147]. Bu HPV primerleri ile yapılan konsensus PCR testlerinin en önemli dezavantajı HPV DNA pozitif saptanan örneklerde hangi tip veya tiplerin olduğunun tanımlanamamasıdır.

HPV pozitifliği olan örneklerde özgül HPV tipinin saptanması amacıyla dizi analizi, hibridizasyon, tipe özgül PCR ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) gibi testler kullanılabilir. Fakat 40'tan fazla mukozal HPV tipi olduğundan her örnek için çok sayıda tipe özgül PCR veya hibridizasyon testinin uygulanması gerekmektedir. Bu da zaman ve iş gücü kaybı nedeniyle rutin uygulamada tercih edilmemektedir. Bu sebeple PCR sonrası HPV tiplendirmesi için PCR-ELISA (mikroplakta hibridizasyon) ve Line Probe Assay gibi genotipleme sistemleri geliştirilmiştir[128].

2.1.8.4.4- Serolojik Testler

HPV enfeksiyonlarında ortaya çıkan immünolojik tepkiler oldukça değişkendir. Bu nedenle serum HPV antikorları ile tümör oluşumu arasında açık bir nedensellik kurmak zordur. Ancak bazı çalışmalarda bu yönde ipuçları

olduğu görülmüştür. Tanı için kullanılmadan önce karsinogenez ile spesifik anti-HPV antikorlarının serolojik pozitifliği arasındaki ilişki araştırılmalıdır.

HPV enfeksiyonunun tanısında serolojik yöntemler sık olarak kullanılmaz. HPV'ye karşı humoral yanıt immünoglobulin G (IgG) ve IgA yanıtlarını içerir. Genel olarak IgG yanıtları, HPV ile karşılaşmış olmanın göstergesi iken, IgA'nın persistan HPV enfeksiyonunun göstergesi olduğu öne sürülmüştür [148]. Diğer çalışmalar, prekanseröz ve kanseröz lezyonlarda IgA yanıtında azalma olduğunu göstermiştir. HPV'ye karşı hücresel immün yanıtlar, HPV enfeksiyonunun serviks kanserine dönüştüğü geç dönemlerde saptanmıştır. Bu immün yanıtlar E7 protein epitoplarına karşı gelişmiş CD8 pozitif sitotoksik T hücrelerden oluşmaktadır. Hastalığın geç döneminde saptanmasına ek olarak, HPV'ye karşı gelişen sitotoksik T hücre yanıtı serviks kanserli hastalar arasında belirgin farklılık göstermektedir ve hastalık göstergesi olarak kullanım potansiyelleri düşüktür [147].

HPV'nin diğer birçok viral etkenin aksine taktiği konak bağışıklık sistemini alt etmek değil onu taklit ederek, kaçınmaya çalışmaktır. HPV enfeksiyonu, cilt ve mukozal yüzeylere dökülen keratinositlerle sınırlı kalarak konak bağışıklık sisteminden kaçmanın yanı sıra inflamasyona ve viremiye yol açmadığı bilinmektedir. Ancak, HPV enfeksiyonlarının bir kısmında belli bir süre sonra tespit edilir bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkar.

Genital siğilleri olan hastalarda ana bağışıklık tepkisinin hücre aracılı olduğu ve genellikle ilk enfeksiyondan 2-12 ay sonra başladığı gösterilmiştir. CD4+ T hücreleri ilk tepki veren hücrelerdir [127]. Humoral bağışıklığın siğillerdeki HPV temizliği üzerindeki etkisi net olmamakla birlikte, HPV'ye karşı antikor yanıtının HPV enfeksiyonunun gerilemesi üzerinde sınırlı bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

Servikal kanserde HPV'nin doğal öyküsü kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve antikorlar geçmiş enfeksiyonların belirteçleri olarak tanımlanmıştır. Buna rağmen, mukozal yüksek riskli tip HPV-16 ile enfekte olmuş kadınların yalnızca %50'si HPV-16'ya karşı antikor geliştirir ve bu süreç ilk enfeksiyondan sonra bir yıldan fazla sürebilir [149]. Ancak, HPV-16 antikorlarının varlığı bir kez

belirlendiğinde, düşük ancak stabil titreler uzun süre tespit edilebilir. Buna karşılık, cildi enfekte eden HPV tiplerine karşı antikorların doğal öyküsü hakkında çok az şey bilinmektedir. Mukozal tiplerde olduğu gibi, kutanöz HPV enfeksiyonu olan kişilerin de yaklaşık yarısında antikor geliştiği görülmektedir.

2.1.8.5- HPV Korunma ve Aşılama

HPV'den primer korunma yolları olarak ilk cinsel ilişki yaşının olabildiğince ileri yaşa çekilmesi, cinsel partner sayısının azaltılması, sigaradan uzak durulması gibi doğal önlemler sayılabilir. Aktif cinsel hayatı olan bireylerin prezervatif kullanımı gibi bireysel koruyucu önlemleri alması gerekir; ancak bunun her zaman yeterli olmadığı bilinmelidir. Bu yüzden genital siğilleri olduğu bilinen bireylerle cinsel temastan kaçınılması oldukça önemlidir. Ancak yüksek riskli HPV'ler çoğunlukla gözle görülür lezyonlara neden olmadığından veya latent enfeksiyonlar şeklinde seyredebildiklerinden dolayı cinsel aktivite yaşındaki kadınların rutin jinekolojik muayenelerini yaptırmaları büyük önem taşımaktadır. Günümüzde HPV DNA testleri, Pap smear ve kolposkopi ile HPV'nin erken tespiti, tedavisi ve invaziv servikal kanser gelişimini önlemede uygulanan sekonder korunma yöntemidir.

HPV-DNA testinin klinikte başlıca üç kullanım alanı vardır; Servikal kanser taramasında 30 yaşın üstündeki kadınlarda Pap testi ile birlikte kullanımı, ASCUS tanısı alan kadınların yönlendirilmesi ve tedavi sonrası hastaların takibi amacıyla kullanımı şeklindedir[109,150]. HPV DNA testinin HSIL tespiti için sensitivitesi %84-100 olup genellikle Pap smear testinin duyarlılığından (%50-70 arasında) oldukça yüksektir. Ancak HPV DNA testinin spesifitesi (%64-95) Pap testinin spesifitesine benzer oranlardadır (%86-100) veya biraz daha düşüktür.

HR HPV testinin 30 yaş üstü kadınlarda yapılması ile risk altındaki bireyler erken dönemde tanınabilir. Bu grupta HR HPV prevalansı %3-7 arasındadır. 30 yaş altındaki kadınlarda ise HPV infeksiyonları geçici olduğundan bu grupta HR HPV testinin yapılmasının klinik önemi pek yoktur. Normal Pap smear ve HPV testinin negatif prediktif değeri %99-100'dür. Bu nedenle HPV testinin servikal kanser taramasında kullanımı önemlidir [109].

Servikal kanseri önlemede en akılcı yaklaşımın düzenli jinekolojik kontroller ve prekanseröz lezyonların erken tedavisi olduğu kabul edilmektedir. Ancak bu tip bir uygulamanın infeksiyonun yaygın olduğu ancak tarama ve tedavi stratejilerinin parasal nedenlerle rutine sokulamadığı gelişmekte olan ülkelerde hayata geçirilmesi zordur. Gelişmiş ülkelerde kadınların %40-85'i, gelişmekte olan ülkelerde ise yaklaşık olarak %5''ii servikal kanser tarama programlarına katılmaktadırlar[21].

HPV infeksiyonlarının doğal seyrine bakıldığında, immün yanıtın etkisiyle çoğu enfeksiyonun zamanla kendiliğinden iyileştiği görülmektedir. Bu tür bir eradikasyondan büyük oranda Th1 tipi hücresel immün yanıt ile kısmen L1 proteinin konformasyonel epitoplarına karşı oluşan nötralizen antikorların sorumlu olduğu bilinmektedir [129].

1970'li yılların başından itibaren HPV ile serviks kanseri ilişkisi ortaya konduktan sonra HPV'nin alt tipleri, neden olduğu hastalık tabloları, etkenin onkojenik özelliği ve immün supresif etkisi ayrıntılı olarak ortaya konmuştur. Aynı dönemlerde başlayan aşı çalışmaları 2006 yılında tamamlanarak ilk HPV aşısı Haziran 2006'da FDA tarafından onaylanmıştır. Günümüzde sayıları 200'ü aşan HPV genotiplerinden 40 kadarı genital sistemi tutmakta olup, bunlardan en az 15'nin serviks kanserlerinin yaklaşık %99'undan sorumlu olduğu gösterilmiştir [32].

HPV aşısı ile ilgili çalışmalarda çeşitli ökaryot hücre modellerinde ekspresse ettirilen virüs benzeri partiküller (VLP) ile olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Nükleik asit içermemeleri nedeniyle tehlike arz etmeyen VLP'ler morfolojik olarak gerçek virionlara benzemektedirler ve güçlü antikor yanıtına yol açarlar [21,136].

HPV aşıları; viral nötralizan antikor oluşturulması hedeflenen ve bireyi yeni infeksiyonlardan koruyan profilaktik aşılar ve HPV ile enfekte epitelyal hücrelerde, hücresel immüniteyi arttırmayı hedefleyen terapötik aşılar olarak ikiye ayrılabilir. Terapötik aşılar viral E6 ve /veya E7 onkogenlerini hedef alarak sitotoksik T hücre yanıtının uyarılmasını hedeflemektedir. HPV ilişkili hastalığın tedavi edilmesi, lezyonların gerilemesi amacıyla geliştirilmektedir ancak henüz

klinik olarak kullanımda değildir ve bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [87,149].

Günümüzde mevcut olan HPV aşıları profilaktik aşılardır. Bu aşılar hastalığı tedavi edemez veya daha önce bulaşan virüsün hastalığa neden olmasını engelleyemez; yalnızca bireyi yeni HPV enfeksiyonlarından korumada etkilidir[117]. HPV aşısının virüsle temastan önce uygulanması gerekir. Her ülke kendi verilerine göre aşı için hedef yaş grubunu belirlemektedir. Örneğin ABD'de HPV aşısı 11-12 yaşlarındaki tüm kız çocuklarına önerilirken ülkemizde 9-25 yaş arası kız çocukları ve kadınlarda endikedir[17,34]. Yakın zamanda 26 yaş üstü kadınlar ve erkeklerin bağışıklanması konusunda yapılan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde erkek çocukları da rutin bağışıklama programlarına alınmış ve aşının uygulanacağı üst yaş sınırını 55 yaşa kadar yükseltmiştir.

HPV aşısı üç doz olarak kas içine uygulanır. Uygulanan bölgedeki lokal reaksiyonlar ve yanma dışında ciddi yan etkiye yol açmaz. HPV aşısının uzun yıllar koruma sağladığı ve büyük olasılıkla rapel doz uygulamasına gerek olmadığı kabul edilmektedir [21, 85].

HPV aşıları immün sistemi uyarmada doğal virüs infeksiyonundan daha etkilidir. Çünkü aşılar intramüsküler yolla uygulanmakta ve böylece antijen sunan hücreleri daha güçlü şekilde uyarmaktadır. Doğal infeksiyon ise çoğunlukla epitele sınırlı kaldığından immün sistem hücrelerini zayıf şekilde uyarır [85].

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA; Food and Drug Administration) onaylı 3 adet profilaktik aşı bulunmaktadır. Kuadrivalan aşı (Gardasil) 2006 yılında, Bivalan aşı (Cervarix) 2009'da 9 valanlı aşı (Gardasil 9) ise 2014 yılında FDA tarafından onaylanmıştır [139]. Bivalan ve kuadrivalan aşı, HPV 16 ve 18'e (servikal kanserlerin yaklaşık %70'inin sebebi) karşı etkili koruma sağlamaktadır. Kuadrivalan aşı, ek olarak HPV 6 ve 11'e (genital siğillerin %90'ından sorumlu) de etkili olmasıyla genital siğillere karşı da koruyuculuk sağlamaktadır. Dokuz valanlı (nonavalan) aşı ise bu dört tipe ek olarak genital

kanserlerin %20'sinin nedeni olan HPV 31, 33, 45, 52 ve 58'e karşı da koruyuculuk sağlamaktadır [140].

3-GEREÇ VE YÖNTEM

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne Ocak 2024- Eylül 2024 tarihleri arasında herhangi bir şikayet ile başvuru yapan 18-65 yaş aralığındaki 401 kadın hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların yaş, medeni durum, doğum sayısı, HPV aşısı gibi sosyodemografik verileri kaydedilmiştir. Hastalarda cinsel aktiviteye başlama yaşı, partner sayısı, cinsel yönelim, eşlik eden ilişkili klinik yakınma ve cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü, sigara kullanımı gibi ek risk faktörlerine yönelik değerlendirme yapılmamıştır.

Araştırma protokolü Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu tarafından 27.09.2023 tarihli ve 50582788-199-625777 sayılı karar ile onaylanmıştır. Proje Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2024-05). Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" ile bilgilendirilerek, imzalı onamları alınmıştır.

Servikal sürüntü örneği almak için gerekli eküvyon ve taşıma besiyeri Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniklerine dağıtılmış ve ilgili hekimler konu hakkında bilgilendirilmiştir. Hastalardan onamları alındıktan sonra smear örnekleri alınmıştır. Endoservikal kanaldan ve tüm transformasyon bölgesinden alınan sürüntü örnekleri Stuart taşıma besiyerine (Copan, Brescia, İtalya) konulmuş ve HPV DNA saptanması için hastanemiz Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ulaştırılmıştır. Örnekler çalışılacağı zamana kadar uygun koşullarda saklanmıştır.

İşlem sırasında ayrıca Pap smear testi için servikal fırça ile alınan sürüntü örneği lam üzerine yayılıp fikse edilerek incelenmek üzere hastanemizin Patoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Örnekler Papanicolaou (Pap) boyası ile boyanıp, Bethesda 2001 terminoloji sistemi esas alınarak sitolojik açıdan değerlendirilmiştir.

Bu hastalardan eş zamanlı olarak standart, ortalama 5 ml venöz kan örneği alınarak Mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır. Laboratuvara ulaşan kan

örnekleri 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş; ayrılan serum kısmı steril ependorf tüplere aktarılarak -20 C° derecede çalışma gününe kadar saklanmıştır.

Servikal smear örneği alınamayan hastalar, gebeler, histerektomi yapılan ve HPV aşısı uygulanan hastalar ile onam formunu imzalamayan ve çalışmaya katılmayı kabul etmeyenler çalışma dışı bırakılmıştır. Aynı zamanda hemolizli ve hiperlipidemik kan örnekleri de hatalı sonuçlar verebileceğinden dolayı işleme alınmamıştır.

Anti HPV IgG antikorlarının tespiti

Serum örneklerinde HPV'ye karşı IgG sınıfı antikorların yarı kantitatif tayini için HPV IgG ELISA-EIA 4907 (DRG Instruments Gmbh, Germany) kiti kullanılmıştır.

Test bileşenleri;

- HPV tip 6, 11, 16 ve 18'den üretilen rekombinant VLP antijenleri ile kaplanmış 72 kuyucuklu mikroplakalar
- Negatif kontrol solüsyonu
- Pozitif kontrol solüsyonu
- Yıkama tamponu konsantresi
- Enzim konjugatı
- Kromojen/ substrat
- Sülfirik asit (H2SO4)
- Numune seyreltici
- Plaka sızdırmazlık folyoları
- Kalibre edilmiş mikropipetler (1000, 100, ve 10 µl ve tek kullanımlık uçlar)
- Bidistile veya deiyonize EIA sınıfı su

- Emici kağıt mendiller
- Zamanlayıcı
- Kalibre edilmiş 37°C ELISA mikroplaka termostatik inkübatörü
- 450 nm filtreli, kalibre edilmiş ELISA mikrokuyuculu okuyucu
- Kalibre edilmiş ELISA mikroplaka okuyucu
- Vorteks veya benzeri karıştırıcılar

Bileşenlerin hazırlanması ve çalışma aşamaları;

- Çalışma öncesi serum örnekleri ve test bileşenleri oda sıcaklığına getirildi.
- Test bileşenleri kit içerisinde kullanıma hazır olarak gönderildi.
- Serum örnekleri tanımlandığı şekilde 1:100 oranında seyreltildi.
- Negatif ve pozitif kontroller 100 µl olarak kuyucuklara dağıtıldı.
- Mikroplaka 37°C'de 60 dak boyunca inkübe edildi.
- Mikroplaka otomatik bir yıkayıcı ile 4-5 kez yıkandıktan sonra her kuyucuğa 100 µl enzim konjugatı eklenerek 37°C'de 60 dak boyunca inkübe edildi.
- 100 µl kromojen/substrat karışımı her kuyucuğa pipetlendi ve mikroplak 20 dakika boyunca oda sıcaklığında (18-24°C) inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklara 100 µl sülfirik asit eklendikten sonra ortaya çıkan renk yoğunluğu 450 nm filtrede okutularak OD hesaplandı.

Sonuçların değerlendirilmesi üretici firma önerileri doğrultusunda yarı kantitatif olarak yapıldı. OD değeri cut off değerinin üzerinde olan numuneler, HPV antijenlerine özgü HPV IgG antikorları açısından reaktif olarak değerlendirildi.

DNA izolasyonu ve amplifikasyonu

Çalışmanın yapılacağı gün çalışılacak kitler ve örneklerin tümü oda sıcaklığına getirildi. HPV DNA tespiti ve tiplendirmesi için öncelikle örneklerden DNA izolasyonu yapıldı. Rotor-Gene® Q MDx cihazı ile QIAscreen HPV PCR Test kiti (Qiagen, Hollanda) kullanılarak, HPV DNA amplifikasyonu üretici firma talimatlarına göre gerçekleştirildi.

QIAscreen HPV PCR testi muhtemel yüksek riskli 15 HPV alt tipinin (tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 ve 68) DNA'sının kalitatif saptanması için geliştirilen bir in vitro multipleks, real-time PCR bazlı testtir. PCR ürününün saptanması için floresan problardan yararlanır. Her bir PCR döngüsü esnasında floresan sinyal, logaritmik bir şekilde artarak bir amplifikasyon eğrisine yol açar. Hedefin amplifikasyon eğrisi, eşik değerin üzerine geldiği anda örnek pozitif kabul edilir. Multipleks formatta her bir floresan boya farklı hedefleri temsil etmekte ve reaksiyon başına dört farklı floresan boyanın aynı anda saptanmasına izin vermektedir. Bu dört farklı hedef; HPV 16, HPV 18, bir havuz olarak diğer 13 hrHPV tipi ve insan β-globin genidir. İnsan β-globin geni hem örnek DNA'nın kalitesini hem de potansiyel inhibe edici maddelerin varlığını belirleyen örnek kontrolü olarak kullanılır.

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar;

- QIAscreen Master Mix (QIAscreen Ana Karışımı)
- QIAscreen Positive Control (QIAscreen Pozitif Kontrolü)
- QIAscreen Negative Control (QIAscreen Negatif Kontrolü)
- QIAamp® MinElute® Media Kits ve QIAsymphony® DSP Virus/Pathogen Kits gibi standart DNA ekstraksiyon kitleri
- 72 kuyulu rotor ile kullanım için 0.1 ml PCR tüp stripleri ve kapakları
- Özel ayarlanabilir pipetler (1–10 µl; 10–100 µl)
- Özel, filtre tapalı, steril, DNAse içermeyen pipet uçları
- Masaüstü santrifüj

- Vorteks karıştırıcı
- Proteinaz K
- Wash Buffer
- Elution Buffer
- High Pure Filtre tüpleri
- Toplama tüpleri
- Rotor-Gene Q için QIAscreen çalışma şablonu
- Yeşil (HPV 16), sarı (HPV Diğer), turuncu (β-globin) ve kırmızı (HPV 18) kanallardaki sinyallerin analizi için QIAscreen kanal analiz şablonları
- Rotor-gene Q yazılım sürümü 2.3.1 veya üzerine sahip Rotor-Gene Q 5plex HRM System veya Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı

Solüsyonlar kit içerisinde kullanıma hazır durumdadır. Çalışma aşamasında, 72 tüplük Rotor-Gene Q MDx cihazında örnek işleme sırasında bir pozitif kontrol, bir negatif kontrol ve 70 adet genomik DNA örneği test edilebilmektedir. Tüp striplerine 15 µl QIAscreen Master Mix dağıtıldı. 5 µl QIAscreen negatif kontrol ve 5 µl positive kontrol eklenerek ayrı ayrı tüpler içerisinde karışım sağlandı. QIAscreen Master Mix içeren uygun tüplere 5 µl örnek eklendi ve karışım sağlandı. Rotor-Gene Q MDx cihazı 95°C'de 10 dakikalık ısınma çalışması yapılarak hazırlandı.

Tablo 2. Rotor-Gene Q MDx cihazında QIAscreen HPV PCR Testi ile bir çalışma için plaka ve rotor kurulumu

Strip	Tüp pozisyonu	Örnek adı	Strip	Tüp pozisyonu	Örnek adı	Strip	Tüp pozisyonu	Örnek adı
1	1	Pozitif Kontrol	7	25	Örnek 23	13	49	Örnek 47
	2	Negatif kontrol		26	Örnek 24		50	Örnek 48
	3	Örnek 1		27	Örnek 25		51	Örnek 49
	4	Örnek 2		28	Örnek 26		52	Örnek 50
2	5	Örnek 3	8	29	Örnek 27	14	53	Örnek 51
	6	Örnek 4		30	Örnek 28		54	Örnek 52
	7	Örnek 5		31	Örnek 29		55	Örnek 53
	8	Örnek 6		32	Örnek 30		56	Örnek 54
3	9	Örnek 7	9	33	Örnek 31	15	57	Örnek 55
	10	Örnek 8		34	Örnek 32		58	Örnek 56
	11	Örnek 9		35	Örnek 33		59	Örnek 57
	12	Örnek 10		36	Örnek 34		60	Örnek 58
4	13	Örnek 11	10	37	Örnek 35	16	61	Örnek 59
	14	Örnek 12		38	Örnek 36		62	Örnek 60
	15	Örnek 13		39	Örnek 37		63	Örnek 61
	16	Örnek 14		40	Örnek 38		64	Örnek 62
5	17	Örnek 15	11	41	Örnek 39	17	65	Örnek 63
	18	Örnek 16		42	Örnek 40		66	Örnek 64
	19	Örnek 17		43	Örnek 41		67	Örnek 65
	20	Örnek 18		44	Örnek 42		68	Örnek 66
6	21	Örnek 19	12	45	Örnek 43	18	69	Örnek 67
	22	Örnek 20		46	Örnek 44		70	Örnek 68
	23	Örnek 21		47	Örnek 45		71	Örnek 69
	24	Örnek 22		48	Örnek 46		72	Örnek 70

Sonuçların değerlendirilmesi

Sonuçlar üretici firmanın önerilerine göre kalitatif olarak değerlendirildi. Sistemde HPV tip 16, tip 18, diğer 13 olası yüksek riskli HPV tipi (tip 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 ve 68) ve internal kontrol amacıyla β-globin geni için dört farklı kanal üzerinden saptama yapıldı. Bu kanallar için kullanılan boyalar ve hedefleri aşağıdaki Tablo 3'te belirtilmiştir. Pozitif ve negatif kontroller ile örneklerin internal kontrolleri her randa belirtilen kriterlere uygun olarak çalışmıştır.

Tablo 3: QIAscreen HPV PCR Testinde kullanılan boyalar

Kanallar	**Hedef**	**Boyalar**
Turuncu	Beta globulin	ROX
Yeşil	HPV 16	FAM
Kırmızı	HPV 18	Cy5
Sarı	Diğer	JOE

3.4. Verilerin Analizi

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizinde SPSS 23.0 Paket Programı kullanılmıştır. Veriler tanımlayıcı istatistikler ile (ortalama, ± standart sapma, ortanca, minimum-maksimum, sayı, yüzde) özetlenmiştir. Sürekli verilerin analizinde iki grubun karşılaştırılmasında T testi, kategorik verilerin analizlerinde kikare testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde kritik p değeri <0,05 olarak kabul edilmiştir.

4-BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 401 hasta 18- 65 yaş aralığında olup yaş ortalaması 44.1 bulundu. Hastaların yaş dağılımları Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4. Çalışmaya alınan hastaların yaş dağılımları

Yaş	Sayı (N)	Yüzde (%)
24 yaş ve altı	6	1,5
25-34 yaş	80	20
35-44 yaş	116	28,9
45-54 yaş	127	31,7
55 yaş ve üzeri	72	18
Toplam	401	100

Hastaların PCR sonuçları değerlendirildiğinde 356'sının (%89) smear incelemelerinde HPV DNA negatif bulunurken, 45 hastada (%11,2) yüksek riskli HPV DNA pozitifliği saptandı. HPV tip dağılımına bakıldığında 30 hastada (%66,6) diğer hrHPV DNA grubu pozitif iken, 6 hastada (%13,3) HPV tip 18, 6 hastada (%13,3) HPV tip 16 saptandı. 3 hastada (%6,6) ise birden fazla HPV DNA alt tipi olduğu tespit edildi. Bu hastaların 1'inde HPV tip 16 ve 18 birlikteliği, 1'inde HPV tip 16 ve diğer hrHPV DNA pozitifliği, 1 hastada ise HPV tip 18 ve diğer hrHPV DNA pozitif bulundu. HPV DNA tip dağılımı tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Çalışma grubunda HPV DNA dağılımı.

HPV tipi	Sayı (N)	Yüzde (%)
HPV tip 16	6	13,3
HPV tip 18	6	13,3
Diğer yüksek riskli HPV tipleri	30	66,6

Birden fazla HPV tipi	3	6,6
Toplam	45	100

Çalışma grubumuzdaki 401 hastanın yaş gruplarına göre HPV DNA pozitifliği değerlendirildiğinde 24 yaş ve altındaki hasta grubunda HPV DNA pozitiflik oranı %16,7, 55 yaş ve üzeri hastalarda ise %13,9 bulundu. 35-44 yaş aralığında %12,1, 25-34 yaş aralığında %11,2 ve 45-54 yaş grubu hastalarda ise HPV DNA pozitifliği %8.7 olarak tespit edildi. Hastaların yaş dağılımları arasında HPV DNA pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamasına rağmen, 24 yaş altında ve 55 yaş üzeri kadın popülasyonunda HPV DNA pozitifliklerinin nispeten daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Yaş dağılımlarına göre HPV DNA pozitifliği tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Yaş gruplarına göre HPV DNA pozitifliği.

Yaş grupları	**HPV DNA pozitif**		**HPV DNA negatif**		**Toplam**		**p değeri**
	Sayı (N)	**Yüzde (%)**	**Sayı (N)**	**Yüzde (%)**	**Sayı (N)**	**Yüzde (%)**	
24 y altı	1	16,7	5	83,3	6	100	0,402
25-34 y	9	11,2	71	88,8	80	100	
35-44 y	14	12,1	102	87,9	116	100	
45-54 y	11	8,7	116	91,3	127	100	
55 y ve üzeri	10	13,9	62	86,1	72	100	
Toplam	45	11,2	356	88,8	401	100	

Çalışma grubumuzu oluşturan 401 kişinin 17' sinde (%4,2) HPV IgG pozitif olarak saptandı. Yaş gruplarına göre HPV IgG pozitifliği değerlendirildiğinde; 24 yaş ve altı popülasyonda serumda HPV IgG antikoru pozitif hasta saptanmazken, 25-34 yaş aralığında hastaların %1,25'inde, 55 yaş ve üzerinde ise %1,4'ünde HPV IgG pozitif bulundu. 35-44 yaş aralığında

hastaların %6'sında, 45-54 yaş aralığında ise %6,3'ünde serum HPV IgG pozitif olarak saptandı (Tablo 7). Yaş grupları ile HPV IgG pozitiflikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,221).

Tablo 7. Yaş gruplarına göre HPV IgG pozitifliği

Yaş Grupları	HPV IgG pozitif		HPV IgG negatif		Toplam		p değeri
	Sayı (N)	Yüzde (%)	Sayı (N)	Yüzde (%)	Sayı (N)	Yüzde (%)	
24 y altı	-	-	6	100	6	100	0,221
25-34	1	1,25	79	98,7	80	100	
35-44	7	6	109	94	116	100	
45-54	8	6,3	119	93,7	127	100	
55y ve üzeri	1	1,4	71	98,4	72	100	
Toplam	17	4,2	384	95,8	401	100	

Çalışmaya grubunda HPV DNA sonucu pozitif bulunan 45 hastanın 8'inde (%17,7) serum HPV IgG antikoru da pozitif bulundu. 37 hastada (%82,2) ise HPV DNA pozitif olduğu halde, serumda antikor saptanmadı.

HPV IgG antikoru pozitif olan 17 hastanın 8'inde (%47) HPV DNA sonucu pozitif iken, 9'unda (%53) HPV DNA sonucu negatif bulundu. HPV tip 16 saptanan hastaların %16,7'sinde, tip 18 saptananların %33,3'ünde, diğer hr-HPV DNA pozitif hasta grubunun ise %16,6'sında serumda HPV IgG antikoru pozitif bulundu. HPV DNA ve HPV IgG antikor pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (p<0,01). HPV DNA ve HPV IgG ilişkisi Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. HPV IgG ve HPV DNA ilişkisi

HPV IgG	HPV DNA pozitif				Toplam	p değeri
	Tip 16	Tip 18	Diğer hrHPV	Birden fazla HPV		
Pozitif	1 (%16,7)	2 (%33,3)	5 (%16,6)	-	8 (%17,7)	p<0,01
Negatif	5 (%83,3)	4 (%66,7)	25 (%8,3)	3 (%100)	37 (%82,2)	
Toplam	6 (%100)	6 (%100)	30 (%100)	3 (%100)	45 (%100)	

Hastaların yaş dağılımlarına göre HPV DNA ve serumda HPV IgG pozitiflikleri değerlendirildiğinde; çalışma grubunda HPV DNA pozitiflik oranı %11,2 iken, serum HPV IgG pozitiflik oranı %4,2 saptandı. 24 yaş ve altında 6 kadının olduğu ve bunlardan 1'inde (%16,7) HPV DNA'nın pozitif olduğu görüldü. Bu yaş grubunda serumda HPV IgG pozitifliği izlenmedi.

25-34 yaş grubundaki 80 hastanın 9'unda (%11,2) HPV DNA pozitif bulunurken, sadece 1 hastada (%1,25) serum antikoru pozitif saptandı.

35-44 yaş aralığındaki 116 kadının 14'ünde (%12,1) HPV DNA pozitif iken, 7 hastada (%6) serum HPV antikoru pozitif idi.

45-54 yaş aralığındaki 127 hastanın 11'inde (%8,7) HPV DNA pozitif bulundu ve bu hastalardan 8'inde (%6,3) serumda HPV IgG antikor varlığı izlendi.

55 yaş ve üzerinde olan 72 kadın hastanın ise 10'unda (%13,9) HPV DNA pozitif iken, bu yaş grubunda serum antikoru pozitif olan yalnızca 1 hasta (%1,4) tespit edildi.

Çalışma grubumuzdaki 401 hastanın servikal smear örneklerinin histopatolojik incelemesinde 358 (%89,3) hastada benign sitoplojik bulgular gözlenirken, 43 hastada (%10,7) herhangi bir epitel hücre anormalliğinin

izlendiği rapor edildi. Saptanan epitel hücre anormallikleri incelendiğinde 23 hastada (%53,5) seyrek metaplastik özellik gösteren endoservikal hücreler, 9 hastada (%20,9) önemi belirsiz atipik skuamöz servikal hücreler (ASC-US) gözlendi. Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal neoplazi (L-SIL) olan 5 hasta (%11,5), servikal intraepitelyal neoplazi derece-1 (CIN-I) olan 3 hasta (%7), servikal intraepitelyal neoplazi derece-2 (CIN-II) olan 2 hasta (%4,6) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal neoplazi (HSIL) olan 1 hasta (%2,3) saptandı (Tablo 9).

Vaka sayıları yetersiz olmakla birlikte başta servikal intraepitelyal neoplaziler (CIN 1 ve 2), yüksek dereceli intraepitelyal neoplazi (HSIL) ve önemi belirsiz atipik skuamöz hücreler (ASC-US) olmak üzere histopatolojik bulgular ile yüksek riskli HPV DNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü (p<0,01).

Tablo 9: Smear sonuçlarına göre HPV DNA pozitifliği.

Histopatoloji sonucu	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam		p değeri
	Sayı (N)	Yüzde (%)	Sayı (N)	Yüzde (%)	Sayı (N)	Yüzde (%)	
Normal	26	7,2	332	92,8	358	100	p<0,01
Seyrek metaplastik hücreler	6	26	17	74	23	100	
ASCUS	6	66,6	3	33,4	9	100	
LSIL	1	20	4	80	5	100	
CIN-1	3	100	-	-	3	100	
CIN-2	2	100	-	-	2	100	
HSIL	1	100	-	-	1	100	
Toplam	45	11,2	356	8,8	401	100	

Çalışmamızda HPV DNA sonucu pozitif bulunan 45 hastanın 18'ininde (%40) herhangi bir servikal hücre anormalliği gözlenirken, 27 hastada (%60) HPV DNA pozitif olduğu halde sitopatolojik anormallik saptanmadı. Birden fazla HPV tipi pozitif olan hastalarda EHD riski en yüksek iken (%66,6), bunu diğer hr-HPV tipleriyle enfekte hastaların takip ettiği görüldü (%43,3). EHD gelişme oranı HPV tip 16 ile enfekte hastalarda %33,3, tip 18 enfeksiyonu olan hastalarda ise %16,6 olarak tespit edildi. Yüksek riskli HPV DNA ile servikal hücre displazisi görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu tespit edildi (p<0,01). HPV DNA ile servikal EHD arasındaki ilişkisi Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 10: HPV DNA ile servikal EHD arasındaki ilişki

EHD	HPV DNA pozitif					HPVDNA negatif	Toplam	p değeri
	Diğer hrHPV	HPV tip16	HPV tip18	1'den fazla HPV tipi	Toplam			
EHD yok	17 (%56,7)	4 (%66,6)	5 (%83,3)	1 (%33,3)	27 (%60)	331 (%93)	358 (%89,3)	
EHD pozitif	13 (%43,3)	2 (%33,3)	1 (%16,6)	2 (%66,6)	18 (%40)	25 (%7)	43 (%10,7)	p<0,01
Toplam	30	6	6	3	45	356	401	

Serum HPV IgG antikoru pozitif olan 17 hastanın 13'ünün (%76,5) Pap smear örneklerinin histopatolojik incelemesi benign olarak rapor edilirken, 4 hastada (%23,5) herhangi bir epitel hücre displazisi rapor edildi. Tüm çalışma grubunda Pap smearda herhangi bir epitel hücre displazisi görülme oranı %10,2 iken, serum HPV IgG antikoru pozitif hasta grubunda bu oran %23,5 olarak saptandı. HPV IgG antikoru ile servikal epitelyal hücre displazisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi (p:0,081). Tüm çalışma grubunda herhangi bir EHD görülme oranı %10,7 saptandı.

Serum HPV IgG ile servikal epitelyal displazi arasındaki ilişki Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Serum HPV IgG ile servikal EHD ilişkisi.

EHD	Serum HPV IgG pozitif		HPV IgG negatif		Toplam	P değeri
	Sayı (N)	Yüzde (%)	Sayı (N)	Yüzde (%)	Sayı	
EHD yok	13	%76,5	345	%90	358 (%89,3)	p=0,081
EHD var	4	%23,5	39	%10	43 (%10,7)	
Toplam	17	%100	384	%100	401	

Çalışma grubunun demografik özellikleri değerlendirildiğinde hastaların 32'sinin (%8) bekar, 369'unun (%92) evli olduğu görüldü. Hiç evlenmediğini belirten 32 hastanın 1'inde (%3,1) HPV DNA pozitif iken, evli hastaların 44'ünde (%11,9) HPV DNA pozitifliği saptandı. Medeni durum ve HPV DNA ilişkisi Tablo 12'de gösterilmiştir.

HPV IgG antikoru pozitif olan 17 hastanın 16'sının (94,1) evli, 1'inin (%5,9) ise bekar olduğu tespit edildi. Serum antikoru negatif ve pozitif hasta grupları arasında yaş ortalaması (44,18; 44,48), ortalama gebelik sayısı (2) ve canlı doğum sayısı (1,8) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı gözlendi.

Tablo 12: Hastaların medeni durumlarına göre HPV DNA pozitifliği

Medeni Hal	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam	
	Sayı (N)	Yüzde (%)	Sayı (N)	Yüzde (%)	Sayı (N)	Yüzde (%)
Evli	44	11,9	325	88,1	369	100
Bekar	1	3,1	31	96,9	32	100
Toplam	45	11,2	356	88,8	401	100

Çalışma popülasyonu parite açısından değerlendirildiğinde bir ve daha az doğum sayısı olan 142 kadın (%35,4), 2-3 doğum yapan 226 (%56,4), 4 ve üzerinde doğum yapan ise 33 (%8,2) kadın olduğu görüldü. Ortalama gebelik sayısı tüm hasta grubu için 2,3; doğum sayısı ise 1.,9 olarak bulundu.

5- TARTIŞMA

HPV, sıklıkla genital sistem infeksiyonlarına neden olmakta ve bütün dünyada servikal kanserin primer etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir. Özellikle genç, seksüel aktif bireylerde çoğunlukla asemptomatik seyretmekte ve bu da hastalığın yayılımında ciddi rol oynamaktadır.

HPV epiteliotropik bir virus olup başta serviks olmak üzere anal, perianal bölge kanserleri, deri ve mukozalarda yaygın siğiller, tekrarlayan respiratuvar papillomatozis ve baş boyun kanserleri ya da orofaringal kanserler gibi çesitli benign ve malign süreçlerin gelişimi ile ilişkili olduğu yapılan birçok moleküler, deneysel, epidemiyolojik ve klinik çalışmalarla ortaya konmuştur.

Küresel olarak kadınların yaşamları boyunca en az bir kez HPV infeksiyonuna yakalanma riskleri %50'den fazladır. Sağlıklı bireylerde görülen HPV infeksiyonlarının yaklaşık %70-90'ının klinik belirti vermeden vücuttan ilk 1-2 yılda temizlendiği gösterilmiştir. Vakaların yaklaşık %10'unda ise persistan enfeksiyonlar olarak karşımıza çıkar. İmmün kompetan hastalarda persistans gösteren ve intraepitelyal neoplaziye ilerleyen enfeksiyonların da yine önemli bir kısmının vücuttan tamamen temizlendiği gösterilmiştir. HPV enfeksiyonu vakaların yaklaşık %1-3'lük kısmında invazyon ve kanser gelişimi ile sonlanmaktadır.

Serviks kanseri açısından risk taşıyan kişilerin belirlenmesi ve uygun klinik takibin gerçekleşmesi için tarama programlarına ek olarak kişideki HPV infeksiyonu varlığının araştırılması ve etken olan HPV tipinin belirlenmesi önem taşımaktadır[42,149]. Ayrıca prekanseröz ve kanseröz süreci destekleyen diğer CYBH'lerin varlığı, çok cinsel eşlilik, erken yaşta cinsel aktiviteye başlama, multipatite, uzun süreli oral kontraseptif ajan ve sigara kullanımı gibi faktörlerin ortaya konması da hastalık seyrinin takibi açısından önemlidir.

Genital bölge mukozal bağışıklık sisteminin bir bileşeni olarak kabul edilse de diğer tipik mukozal dokular ve vücut salgılarında bulunmayan birkaç temel özellik göstermektedir. Dış vücut salgıların çoğunda karakteristik olarak salgısal immün globulin A (S-IgA) baskınlığı gözlenirken, genitoüriner sistem

salgılarında (semen ve servikovaginal sıvı) IgA'dan ziyade IgG baskınlığını söz konusudur [151].

Dişi genital sisteminde antikorların hem indüksiyonu hem de salgılanmasının üreme hormonları olan östrojen ve progesterona bağlı olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Örneğin, vajinal salgılardaki IgG ve IgA konsantrasyonları ve antijen sunumunun östradiol tarafından baskılandığı, uterus salgılarındaki immün yanıtların ise östradiol tarafından arttırıldığı gösterilmiştir. Ayrıca genital sistem mukozasında intestinal mukozaya göre peyer plakları benzeri immün donanımın olamaması nedeniyle enfeksiyonlarla (örneğin gonore, HPV ve HIV gibi) uyarılan lokal humoral ve hücresel bağışık yanıt tepkileri zayıftır veya yoktur. Enfektif ajan ile tekrarlanan lokal maruziyet minimal humoral tepkilerle sonuçlanmaktadır [149].

Dünya genelinde HPV enfeksiyonları ile ilgili seroprevalans verilerine bakıldığında sonuçların oldukça değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Genel popülasyonda mukozal yüksek riskli HPV tip 16 ile enfekte olmuş kadınların yalnızca %50'sinin geç dönemde HPV-16'ya karşı antikor geliştirdiği bilinmektedir[152]. Mukozal tiplerde olduğu gibi, kutanöz HPV enfeksiyonu bulunan kişilerin de yaklaşık yarısının antikor geliştirdiği görülmekte ve HPV ile enfekte olan bazı kişilerin neden antikor üretip bazılarının ise üretmediği henüz net olarak bilinmemektedir[153]. Kullanılan serolojik yöntemlerin yanı sıra değerlendirilen HPV alt tiplerinin, hasta yaşının, cinsiyetin, immün sistem aktivitesi gibi faktörlerin bunda etkili olduğu düşünülmektedir.

Genital siğilleri olan hastalarda ana bağışıklık sistemi tepkisinin hücre aracılı olduğu ve CD4+ T hücrelerinin ilk tepki veren hücre grubu olduğu bilinmektedir. Bu hücrelerin HPV enfeksiyonlarındaki önemi, organ nakli yapılan ve immün supresif tedavi alan hastalarda siğillerin ve HPV ile ilişkili malignitelerin sıklığında artışa yol açmasındandır[154]. İmmün supresyon durumunda kutanöz HPV tiplerine karşı gelişen humoral bağışıklık hakkındaki bilgi sınırlı olsa da, organ nakli yapılan hastalar genel popülasyona benzer seroprevalans göstermiştir [155].

Humoral bağışıklığın HPV'nin vücuttan temizlenmesi üzerine olan etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte, hücresel bağışıklığa göre daha sınırlı bir etkisinin olduğu kabul edilmektedir [152]. Ayrıca genelde ilk enfeksiyondan 2-12 ay sonra ölçülmeye başladığı göz önünde bulundurularak, antikor yanıtlarını geçmiş enfeksiyonun belirteçleri olarak tanımlayan çalışmalar vardır [156].

Çek Cumhuriyeti'nde 1-80 yaş arası genel popülasyonda HPV kaynaklı antijenlere karşı antikorların yaşa bağlı yaygınlığını araştıran bir çalışmada yaklaşık %60'a varan pozitiflik oranları ile en yüksek yaygınlık 13 ila 30 yaş arasındaki bireylerde bulunmuştur. Tip 16 veya 18'den türetilen VLP'lere karşı antikorların sıklığı yaşla birlikte artarken, tip-33 VLP'lere karşı antikorlar 21-25 yaş grubunda zirveye ulaşmış ve sonrasında değişmeden kalmıştır. Bu farklılıkta virüslerin eşit olmayan immünojenik özellikleri, farklı dönemlerde bireysel virüs tiplerinin değişen yaygınlığı, çeşitli virüs tipleri ve/veya varyantları arasında farklı kalıcılık yeteneği gibi bir dizi faktörün söz konusu olabileceği düşünülmüştür [157].

HPV tip 11, 16, 18 veya 33 genotiplerine karşı seropozitifliğin cinsel davranışla ilişkisini araştıran bir çalışmada yaşam boyu seks partneri sayısına göre gruplandırılan 274 kadın hasta incelenmiştir. Yaşam boyu bir cinsel partneri olanlarda HPV seropozitifliği %4 bulunurken, beş veya beşten fazla partneri olanlarda seropozitivitenin %35'e çıktığı görülmüştür. Bu da HPV tip 16, 18 veya 33 enfeksiyonunun kadınlarda en önemli bulaş yolunun cinsel yol olduğunu ve HPV serolojisinin popülasyonlarda cinsel davranış belirteci olarak kullanılmasının uygun olacağını göstermiştir [158].

Serum antikor yanıtı ile HPV tip 16 enfeksiyonu arasındaki zamansal ilişkiyi inceleyen bir çalışmada 325 üniversiteli kadın, 4 aylık aralıklarla muayene edilmiş ve her görüşmede PCR ve Pap taraması için örnekler ile, ELISA için serum örneği alınmıştır. Seroreaktivitenin, HPV-16 DNA pozitifliği ve artan sayıda cinsel partner ile ilişkili olduğu görülmüş ve yeni HPV-16 enfeksiyonu gelişen kadınlarda serokonversiyona kadar geçen medyan süre 8,3 ay olarak belirlenmiştir. HPV-16 DNA tespitinden sonraki 16 ay içinde, yaygın enfeksiyonu olan kadınların %93,7'si ve yeni enfeksiyon saptanan kadınların

%67,1'inde serokonversiyon gelişmiş ve bu kadınlarda HPV tip 16 ile ilişkili skuamöz intraepitelyal lezyonlara sahip olma olasılığının, serokonversiyon gelişmeyen kadınlara göre 5,7 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [86].

Son yıllarda artan baş boyun kanseri (HNC) hastalarında viral onkoproteinlerden olan HPV-16 E6 ve E7'ye karşı gelişen HPV antikorları ile yapılan çalışmalarda, bu antikorların tedavi sonrası HNC hastalarında sağkalımın potansiyel prognostik belirteçleri olabileceği belirtilmektedir [159]. Ayrıca HPV 16 E6 ve E7 onkoproteinlerine özgü antikorların tespit edilmesinin, HPV etiyolojisinin belirlenmesi yanı sıra HPV pozitif baş boyun tümörlü hastalarda nüksün bir belirteci ve prognostik bir göstergesi olarak da faydalı olduğu sonucuna ulaşan çalışmalar bulunmaktadır [160].

Pittsburgh Üniversitesi'nde 2003-2013 yılları arasında 161 orofaringeal kanser (OPC) vakasının incelendiği çalışmada, HPV16 E6 antikorlarının OPC'nin tanısı ve prognozu için potansiyel klinik faydaya sahip olduğu gösterilmiştir. Zhang ve ark.'nın yaptığı bir çalışma, HPV kaynaklı orofaringeal kanserlerin (OPC) tanısında HPV onkojenik antikorların yüksek seroprevalansını doğrulamaktadır. HPV16 E6 antikor seviyelerinin tedaviden sonra azaldığı, ancak çoğu vakada iki yıla kadar seropozitivite gözlendiği bildirilmiştir. Tanı anındaki HPV16 E6 antikor seviyelerinin orofaringeal kanserlerde hastalığın tekrarlamasında öngörücü olmadığı sonucuna varılmıştır[161]. HPV16 kapsid antikorlarının anal bölge kanserleri için de serolojik belirteçler olduğunu düşündüren çalışmalar mevcuttur[149].

Toplum sağlığı açısından ciddi önem taşıyan HPV enfeksiyonlarının tanısı, HPV tiplerinin saptanması, eşlik eden faktörler, sistemik immün yanıt düzeylerinin tespiti hastalığın seyri ve prognozunun belirlenmesinde önem taşımaktadır.

Çalışmamızda bölgemizdeki aşısız, cinsel aktif, kadın hasta popülasyonunda mevcut HPV alt tiplerinin tanımlanması ve bu hastalardaki sistemik IgG yanıtının ortaya konması hedeflenmiştir. HPV ilişkili seropozitivite çalışmaları küresel olarak aşı çalışmalarını ve kanser araştırmalarını

kapsamaktadır. Ülkemizden aşısız hasta popülasyonunda HPV ile ilişkili seropozitivite oranlarını bildiren çalışmaya rastlanmamıştır.

Genel popülasyondaki kadınlarda HPV prevalans oranları farklı coğrafik bölgelere göre büyük değişkenlik göstermektedir. Bunun yanı sıra HPV prevalanslarındaki bu farklılıkların çalışılan hasta popülasyonları ve kullanılan tekniklerin sensitivitesindeki farklılıklardan da kaynaklandığı düşünülmektedir. Dünya genelinde kadınlardaki HPV infeksiyon prevalans oranlarının %2-44 arasında değiştiği rapor edilmektedir[153,156, 157].

Bizim çalışmamızda HPV tip 16,18 ve diğer 13 farklı HR-HPV tipini kapsayan yüksek riskli HPV DNA pozitiflik oranı %11,2 bulunmuştur. Akçalı ve ark.'nın 2013 yılında hastanemizde yaptıkları araştırmalarında 410 kadın hastada herhangi bir HPV genotipi için buldukları pozitiflik oranı %8,5 olarak bildirilmektedir. Bu hastalar arasında 26 farklı HPV genotipi tanımlanmış ve en yaygın tip HPV 16 (%28,5) olarak belirlenmiştir. Bunu %11,4 oranıyla tip 45 ve 53 izlemiştir. Hastaların %65,7'sinin yüksek risk, %11,4'nün muhtemel yüksek ve %22,9'nun düşük risk HPV tipleri ile enfekte olduğu belirtilmektedir[162]. Bu çalışma sonuçlarına göre 2013 yılında yaklaşık %5,8'e denk gelen yüksek riskli HPV pozitiflik oranının, 11 yıl sonra %11,2'ye yükselmesi bölgemiz için dikkat çekicidir.

Ülkemizde yapılan benzer çalışmalara bakıldığında Beka ve ark. 418 hastanın servikal sürüntü örneklerinde HPV DNA araştırmış, 35'inde (%8,3) LR-HPV DNA, 57'sinde (%13,6) HR-HPV DNA, 17'sinde (%4) ise hem düşük hem de yüksek riskli HPV DNA pozitifliği saptamışlardır. Bu çalışmada Hibrid capture yöntemi kullanılmıştır[163].

Özçelik ve ark. Hybrid capture 1 yöntemini kullanarak yaptıkları bir diğer araştırmada 230 hastayı incelemişler, hastaların 14'ünde (%6,1) HPV DNA pozitifliği bildirmişlerdir. Bu çalışmada genotiplendirme yapılmamıştır[164]. Benzer şekilde Öztürk ve ark. 2004 yılında yaptıkları çalışmada Jinekoloji polikliniğine gelen ve rastgele seçilen 206 hastada Hybrid Capture metodu kullanarak HPV DNA araştırmışlar ve bu oranı %4,9 olarak saptamışlardır [165].

Ağaçfidan ve ark.'nın İstanbul'da yaptığı başka bir araştırmada Pap smear taramasında atipik sonuç elde edilen 470 kadın ve asemptomatik 179 kadın Hybrid Capture 2 sistemi kullanılarak incelenmiş ve 420 örneğin 71'inde (%16,9), 179 örneğin ise 11'inde (%6,1) yüksek riskli HPV DNA sonucu pozitif bulunmuştur[166]. Türkiye'de yapılan ve 1 milyon HPV taramasına dayanan çalışmaya göre servikal HPV pozitifliği %3,5 olarak tespit edilmiştir[167]. Benzer şekilde Türkiye'de çok merkezli olarak yapılan ve 350 binden fazla hastanın smear sonucunu kapsayan bir çalışmaya göre smear anormalliği oranı %5,08 olarak tespit edilmiştir[168]. Bildirilen pozitiflik oranları karşılaştırıldığında çalışma popülasyonu, kullanılan yöntem ve coğrafi bölge farklılıkları gibi birçok faktöre bağlı olarak oranların oldukça farklı olduğu dikkati çekmektedir.

Dünya genelinde HPV DNA prevalansı ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında; Rassu ve ark.'ları 2005'te Kuzeydoğu İtalya'da servikal sitolojileri anormal olan hastaların servikal sürüntü örneklerini incelemişler ve HPV genotiplerinin prevalansını araştırmışlardır. Çalışmada 1335 hastadan 471'inde (%35,3) HPV DNA pozitif bulmuşlardır. Bu hastalarda HPV tip 16 en baskın tür olarak rapor edilmiştir[169]. Beerens ve ark. 2005 yılında Belçika'da yaptıkları çalışmada ise yine servikal sitolojileri anormal olan 780 hastanın servikal sürüntü örneklerinde Line Prob yöntemiyle HPV genotiplemesi yapmışlar ve 513 (%65,8) örnekte HPV DNA pozitifliği saptamışlardır. Çalışmada %18,3 oranla HPV tip 16 en sık karşılaşılan HPV alt tipi iken, bunu HPV tip 51, 53, 52, 31, 38 ve HPV tip 18'in izlediğini bildirmişlerdir[170].

Finan ve ark. 2001 yılında yaptıkları çalışmada normal ve anormal sitoloji gösteren 126 hastadan aldıkları servikal örneklerde HPV DNA genotiplemesi yapmışlar, bu örneklerden 55'inde (%43) HPV DNA pozitifliği bulmuşlardır ve HPV DNA pozitif örneklerden %63'ünde HPV tip 16, %9'unda tip 18, %7'sinde ise tip 33 pozitifliği saptamışlardır. Dunne ve arkadaşları 2003-2004 yılında Amerika'da 14-59 yaş arası 1921 kadında PCR ile GMY09/11 primerlerinin kullanarak yaptıkları çalışmada HPV infeksiyon prevalansını %26,8 olarak tespit etmişlerdir. Yüksek riskli HPV prevalansını %15,2, düşük riskli HPV prevalansını ise %17,8 olarak bildirmişlerdir. En yüksek prevalans 20-24 yaş

arası grupta %44,8, en düşük prevalans ise 50-59 yaş grubunda %19,6 olarak tespit edilmiştir [171].

Asya ülkelerine bakıldığında Sowjanya ve ark.'nın 2005 yılında Hindistan'da servikal karsinomalı ve normal hastalar üzerinde PCR temelli Line Blot Assay yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada, 41 servikal kanserli hastanın %88'inda HPV DNA pozitifliği saptamışlardır. Bu çalışmada en sık görülen HPV alt tipleri %66 oranla HPV tip 16, %19'unda ise HPV tip 18 olarak bulunmuştur. Normal sitolojik bulgulara sahip 185 hastanın %10,3'ünde HPV DNA pozitifliği rapor edilmiştir [172]. Anguiano ve ark.'nın Meksika'da yaptıkları 498 hastadan oluşan prevalans ve genotiplendirme çalışmasında PCR metoduyla 24 hastada (%4,8) HPV DNA pozitifliği saptanmış olup bunların %75'i HPV tip 16 olarak tanımlanmıştır [173].

Nyari ve arkadaşlarının Macaristan'da 2000 yılında yaş ortalaması 35,5 olan 397 asemptomatik kadında Hibrid Capture II metodunu kullanarak yaptıkları bir çalışmada HPV DNA prevalansı %23, yüksek riskli HPV prevalansı ise %16 olarak rapor edilmiştir. HPV DNA pozitif bulunan hastaların yaklaşık %37'sinin 24 yaş ve altında olduğu ve bunların %69'unda patolojik servikal sitoloji sonuçların varlığı bildirilmiştir[174].

Dünyanın farklı bölgelerinden yapılan çalışmalarda servikal sürüntü örneklerinden HPV DNA saptanma oranlarında %30'lardan %85'lere kadar değişen oranlar bildirilmektedir. Buna neden olarak kullanılan tekniklerin duyarlılıkları, alınan hasta örneklerinin kalitesi, seçilen hasta popülasyonunun özellikleri gibi temel faktörler çalışma sonuçlarının değişmesinde önemli rol oynadığı tahmin edilmektedir.

Çalışmamızda 401 hastanın Pap smear incelemelemelerine bakıldığında herhangi bir sitopatolojik anormallik gözlenme oranı %10,7 (43 hasta) olarak saptanmıştır. Hastaların 23'ünde (%53,5) seyrek metaplastik özellik gösteren endoservikal hücreler, 9'unda (%20,9) ASC-US, 8'inde (%18,6) düşük dereceli intraepitelyal neoplazi (L-SIL ve CIN-I), 3'ünde (%6,9) yüksek dereceli intraepitelyal neoplazi (CIN-II ve HSIL) ile uyumlu sitolojik bulgular rapor edilmiştir.

Yerlikaya ve ark.'nın 2023 yılında yaptığı bir çalışmada 18 yaş ve üzeri cinsel aktif 383 hastanın 19'unda (%4,9) 15 farklı yüksek riskli HPV genotiplerinden birinin pozitif olduğu bulunmuştur. Hastaların %26,3'ü HPV tip 16, %5,2'sinde HPV tip 18, %68,4'ünde ise diğer hrHPV alt tiplerinden birinin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bethesda sınıflamasına göre hastaların 29'unda (%7,5) epitel hücre displazilerinden birinin eşlik ettiği ve önemi belirsiz atipik servikal hücrelerin (ASC-US) %65,5 oranla en sık görülen sitopatolojik bulgu olduğu rapor edilmiştir [175].

Ülkemizden yapılan bir başka çalışmada 2020 yılında, 20 yaş ve üzeri 1068 örneğin 226'sında (%21,1) HPV DNA pozitif bulunmuş ve bu örneklerin %32,3'ü HPV tip16, %16,3'ü çoklu tipler ve %51,3'ü diğer yüksek riskli tipler olarak tanımlanmıştır. HPV DNA pozitif olan hastaların %8,8'inde anormal sitolojik bulgular saptanırken, bunların büyük çoğunluğunun LSIL (%65) olduğu bildirilmiştir[176].

HPV sistemik infeksiyonlardan ziyade anogenital bölge başta olmak üzere cilt ve mukozalarda lokal enfeksiyonlar şeklinde karşımıza çıkmaktadır. HPV'ye karşı gelişen sistemik immün yanıtın buna paralel olarak oldukça zayıf olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Ancak HPV L1 kapsid antijenine karşı gelişen anti-L1 serokonversiyonunun kişiyi yeni enfeksiyonlardan koruyucu etkisinin olduğu da kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda doğal enfeksiyon geçiren hastalarda geç dönemde ve düşük titrede antikor yanıtının geliştiği ve olguların %30-50'sinde seropozitivite gelişmediği bildirilmektedir.

Çalışmamızda toplumda en sık görülen HPV alt tipleri olan tip 6,11,16,18'den birine karşı gelişen serum IgG antikor yanıtlarındaki pozitiflik oranı %4,2 (17 hasta) olarak bulunmuştur. HPV enfeksiyonu ile karşılaşan bireylerde serum antikor yanıtı gelişme oranı %50-70 arasında bildirilmekteyken, bizim çalışmamızda HPV seropozitivite oranın düşük olmasının temel nedeninin seçilen hasta popülasyonunun özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışma grubu Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran aşısız, smear örneği alınan, cinsel aktif yaş grubu

kadınlardan oluşmaktaydı. Hastaların klinik bulguları, eşlik eden diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklar, ilk cinsel aktivite yaşı, cinsel yönelim ve partner sayısı, OKS kullanımı gibi faktörler göz önüne alınamamıştır. Bunun yanı sıra kullanılan serolojik testlerin duyarlılıklarının da çalışma verilerini etkileyebileceği düşünülmektedir.

Ülkemizde HPV antikorlarının araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dünya genelinde bu konudaki literatür bilgileri tarandığında, HPV ilişkili seropozitivite çalışmalarının daha çok aşı çalışmaları ile ilgili olduğu görülmektedir. Bunun yanısıra son yıllarda üzerinde daha çok durulmakta olan HPV ilişkili orofaringeal skuamöz hücre karsinomları (OPSCC) alanında da HPV viral onkoproteinleri olan E6 ve E7'ye karşı gelişen immün yanıt tepkileri incelenmektedir. Çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmekle birlikte genel olarak HPV ilişkili OPSCC hastalarında bir tarama yöntemi olarak HPV E6 ve E7 antikor testinin faydalı olabileceği düşünülmektedir. Fahkry ve ark.'nın yaptığı çalışmada HPV'ye bağlı OPSCC olan hastalarda E6/E7 antikorlarında tedavi ile bir düşüş olduğu ve kalıcı veya tekrarlayan hastalığı olanlarda ise E6/E7 antikorlarının üretiminin devam ettiği gösterilmiştir [177].

HPV'yi orofaringeal mukozada prekanseröz dönüşüm için bir risk faktörü olarak kabul eden çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. 2011 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı ve Ulusal Kanser Enstitüsü (ABD), HPV-16'yı OPSCC ve baş boyun kanserleri için bağımsız bir risk faktörü olarak bildirmiştir. Bu hastalarda HPV pozitif olguların negatif olanlara kıyasla belirgin şekilde daha iyi bir prognoza sahip olduğunu bildiren çalışmalar vardır. Lang ve ark.'nın yaptığı çalışmada HPV16 E6 antikorlarının HPV ilişkili OPC'nin tanısı ve/veya prognozu için potansiyel klinik faydaya sahip olduğu sonucuna varılmış, ancak test performansının serolojik analizler arasında farklılık gösterdiği ifade edilmiştir[178].

Yapılan bazı çalışmalarda HPV 16 kapsid antikorlarının anal kanser için serolojik belirteç olabileceği bildiren çalışmalar da vardır. Ayrıca birkaç HPV antikorunun (HPV 16 epitopları olan L1, E2, E7'ye karşı gelişen IgG ve tip 18 E2'ye karşı gelişen IgA yanıtı) özellikle servikal kanserle güçlü bir şekilde ilişkili

olduğunu ve HPV enfeksiyonunun servikal kanserde etiyolojik bir rolü olduğuna dair seroepidemiyolojik olarak destek sağladığını göstermektedir [158].

HPV ile enfekte kişilerde serumda antikor saptanması mutlak bir durum değildir. Geçirilmiş HPV enfeksiyonundan sonra sürüntü örneklerinde HPV-DNA negatif bulunan hastalarda antikor tespit edilebileceği gibi, aktif HPV enfeksiyonu olan HPV-DNA pozitif hastalarda antikor yanıtı tespit edilmeyebilmektedir. Yapılan çalışmalarda HPV enfeksiyonu ile karşılaşmış hastalarda seropozitivite gelişme oranı %50-70 arasında bildirilmektedir [153,156]. Serum antikor düzeyi aktif ve/veya geçirilmiş enfeksiyonları ayırt edemez. Bu sebeplerden dolayı HPV tanısında serolojik yöntemler pek tercih edilmemektedir. Dünya genelinde bu alandaki çalışmalar daha çok viral onkoproteinler olan E6 ve E7'ye karşı gelişen immün yanıt ve bu immün yanıtın enfeksiyon seyrinde ortaya çıkan reenfeksiyonlar ve prekanseröz ya da kanseröz lezyonlara ilerlemedeki rolünü aydınlatmaya yönelik yapılmaktadır.

Çalışmamızda serum HPV IgG yanıtı pozitif saptanan 17 hastanın 8'inde (%47) yüksek riskli HPV DNA pozitifliği tespit edildi. Smear incelemelerinde HPV DNA sonucu pozitif bulunan 45 hastanın 8'inde (%17,7) ise serum antikor yanıtı pozitifliğinin de eşlik ettiği izlendi. Çalışmamızda HPV DNA pozitif olan hastalarda saptanan seropozitivite oranının literatürde bildirilen oranlara göre daha düşük olduğu bulunmuştur; bunun nedeni olarak antikor ölçümü için kullanılan serolojik test yönteminin duyarlılığının düşük olması ya da sınırlı HPV tiplerini saptamaya yönelik testler olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Serum HPV IgG antikoru pozitif bulunan hastalardaki HPV DNA alt tiplerine bakıldığında vakaların %33'ünde HPV tip 18, yaklaşık %17'sinde ise diğer hrHPV tipleri ve HPV tip 16'nın enfeksiyondan sorumlu olduğu görülmüştür; ancak vaka sayılarının yetersiz olmasından dolayı fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çalışma grubumuzda herhangi bir epitel hücre displazisi (EHD) saptanma oranı %10,7 iken, serumda HPV IgG antikoru pozitif olan hasta grubunda EHD saptanma oranı %23,5 bulunmuştur. Pap smear incelemesinde rapor edilen

sitopatolojik bulgular değişkenlik göstermekle birlikte, HPV ilişkili seropozitivitenin hastaların prekanseröz süreçler açısından uzun süreli izlemlerinde yol gösterici fikirler verebileceği düşünülmüştür. Ancak bu alanda daha geniş hasta grupları ile ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Manisa ilinde Jinekoloji polikliniğine başvuru yapan, cinsel olarak aktif kabul edilen 18-65 yaş aralığındaki 401 kadın hastanın, smear incelemelerinde HPV DNA prevalansı ve serumda HPV IgG antikor varlığı araştırılıp sonuçlar karşılaştırılmış ve eşlik eden sitopatolojik verilerle birlikte değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda 45 hastada (%11,2) hrHPV DNA pozitif bulunmuştur. HPV tip dağılımları incelendiğinde 6 hastada (%13,3) HPV tip 16, 6'sında (%13,3) HPV tip 18, 30'unda (%66,6) diğer hr-HPV tiplerinden birinin (HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 ve 68) pozitif olduğu saptanmıştır. 3 hastada (%6,6) ise birden fazla HPV DNA tipinin pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Yaş gruplarına göre HPV pozitiflik oranları değerlendirildiğinde 24 yaş altı popülasyonda HPV DNA pozitifliğinin en yüksek olduğu (%16,6) saptanmıştır. Ancak bu yaş grubu hasta sayısı yeterli olmadığı için bu konuda daha geniş hasta gruplarıyla yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hastalardan eş zamanlı alınan Pap smear incelemeleri ile eşlik eden sitopatolojik bulgular da değerlendirilmiştir. Yüksek riskli HPV DNA sonucu pozitif bulunan 45 hastanın 27'sında (%60) benign sitolojik bulgular rapor edilirken, 18 hastada (%40) herhangi bir epitel hücre displazisinin olduğu saptanmıştır. Sitolojik olarak servikal intraepitelyal neoplaziler (CIN I, II), yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazi (HSIL) ve önemi belirsiz atipik skuamöz hücre (ASC-US) tespit edilen hastalarda yüksek riskli HPV DNA saptanma oranlarının belirgin şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak hasta sayısı az olduğu için bu alanda daha ileri çalışmaların faydalı olacağı düşünülmektedir.

Hastalardan klinik özellikleri göz önüne alınmadan eş zamanlı olarak serum örnekleri alınmış ve ELISA yöntemiyle HPV IgG antikor varlığı araştırılmıştır. Toplumda en yaygın görülen tipler olan HPV tip 6,11,16 ve 18'e spesifik IgG antikor pozitifliği 17 hastada (%4,2) tespit edilmiştir. Bu hastaların 8'inin (%47)

smear incelemesinde HPV DNA pozitif saptanırken, 9'unda (%53) HPV DNA negatif bulunmuştur.

Serum antikoru pozitif olan 17 hastanın sitopatolojik verileri incelendiğinde 4'ünde (%23,5) eşlik eden herhangi bir epitel hücre displazisinin olduğu görülmüştür. HPV IgG pozitif olan 13 hastanın ise (%76,5) sitolojik bulguları normal saptanmıştır. HPV DNA negatif hasta grubunda epitel hücre displazisi görülme oranı %7 iken, serum HPV IgG antikoru pozitif olan hasta grubunda bu oran %23,5 bulunmuştur.

Seksüel olarak aktif dönemdeki kadın ve erkek popülasyonda HPV enfeksiyonları genellikle asemptomatik seyretmekte ve özellikle genç kadınlarda enfeksiyonun oldukça sık olduğu bilinmektedir. HPV bulaşı açısından en önemli risk faktörlerinin cinsel aktivite ve cinsel partner sayısı olduğu kabul edilmektedir. Genç kadınlarda aktif transformasyon bölgesindeki atipik metaplazinin olası çeşitli dış etkenlere çok daha duyarlı olduğu göz önünde bulundurulduğunda, özellikle seksüel aktif dönemde klinik ve asemptomatik HPV enfeksiyonlarının erken tanı ve tedavisi ciddi önem taşımaktadır.

Ülkemizde genital HPV infeksiyonunun prevalansı, epidemiyolojik özellikleri ve serolojik profilleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu araştırma bölgemizdeki cinsel aktivite çağındaki kadınlarda yüksek riskli HPV prevalansının belirlenmesinin yanısıra, aynı zamanda seroprevalans verileri ve sitopatolojik veriler ile karşılaştırma olanağı sağlayan bir çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Ayrıca hastanemizde Akçalı ve ark.'nın benzer hasta grubu ile 2013'te yaptıkları çalışma verileri ile karşılaştırıldığında bölgemizde yüksek riskli HPV DNA pozitiflik oranlarında ciddi artış olduğu dikkati çekmektedir. Ayrıca en sık görülen HPV genotiplerinde de belirgin değişiklikler olduğu ortaya konmuştur. Bu alanda bölgemizde eğitici, bilgilendirici programalara, aşılama ve tarama programlarına ağırlık verilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Gelecekte servikal kanser tarama programlarının geliştirilmesinde ve HPV aşılama stratejilerinin belirlenmesinde HPV DNA ile seroprevalans verilerinin kullanılmasının hastalık tanısı ve hasta takip süreçlerine katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bu konuda daha geniş hasta grupları ile daha ayrıntılı çalışmaların planlanması uzun vadede bireysel olarak hasta yönetimi ve toplumsal olarak da korunma ve aşılama stratejilerinin daha etkin şekilde planlanması açısından yararlı olacaktır.

7-ÖZET

HPV tüm dünyada en sık görülen CYBH'lardan olup, servikal kanserin major etyolojik ajanıdır. Bu çalışmada bölgemizde cinsel aktif dönemdeki kadınlarda HPV infeksiyonunun prevalansının belirlenmesi ve serum HPV IgG yanıtlarının saptanarak sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Manisa'da Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran ve servikal smear örneği alınan 18-65 yaş arasındaki 401 kadın hastada real time PCR yöntemiyle HPV DNA araştırılmış ve hastaların %11,2'sinde hr-HPV DNA pozitif bulunmuştur. En sık görülen HPV tipi %66,6 ile diğer hr-HPV alt tiplerinden biri iken, HPV tip 16 ve tip 18 %16,6 sıklıkta, birden fazla HPV tipi pozitifliği %6,6 sıklıkta saptanmıştır.

Yaş gruplarına göre bakıldığında en sık HPV DNA pozitifliği 24 yaş ve altında görülürken (%16,7), ikinci sıklıkta 55 yaş ve üzeri hasta popülasyonunda (%13,9) izlenmiştir. Sitopatolojik incelemelerde tüm hastaların %10,7'sinde herhangi bir epitel hücre displazisi saptanırken, HPV DNA pozitif olan grupta sitopatolojik anormallik saptanma oranı %40 olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda HPV enfeksiyonu varlığında seropozitivite gelişme oranı yaklaşık %50 olarak bildirilirken, çalışmamızda bu oran %4,2 bulunmuştur. Düşük seropozitivitenin çalışma grubunun rastgele seçilmiş olması ve hastaların yakınma, klinik bulgularının göz ardı edilmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Serumda HPV IgG saptanan hastalarda hr-HPV DNA pozitifliği %47 iken, bu hasta grubunda sitopatolojik anormallik görülme oranı %23,5'tur.

Sonuç olarak; serviks kanserinde uzun bir preinvaziv sürecin varlığı, tarama programlarının önemini göstermektedir. Özellikle seksüel aktif yaş grubundaki hastalarda HPV'nin taranması, uygun klinik yaklaşımın ve korunma stratejilerinin belirlenebilmesi için PCR yöntemleri hızlı, kolay ve güvenilir yöntemlerdir. Ancak özellikle yüksek risk altındaki hasta gruplarında moleküler yöntemlere ek olarak serolojik testlerin uygulanması korunma ve aşılama

stratejilerinin ve prekanseröz süreçte hasta takip programlarının daha etkin olarak planlanabilmesi açısından yol gösterici olacağı düşünülmektedir. HPV prevalansı ve tiplerinin dağılımı ile serolojik profilleri belirlemeye yönelik daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: HPV, HPV DNA, serviks kanseri, HPV IgG antikoru, ELISA

7-ABSTRACT

HPV is one of the most common STDs worldwide and is the major etiological agent of cervical cancer. This study aimed to determine the prevalence of HPV infection in sexually active women in our region and to compare the results by determining serum HPV IgG responses.

HPV DNA was investigated in the smear samples of 401 female patients aged between 18-65 who applied to the Gynecology outpatient clinic in Manisa and had cervical smear samples taken using real-time PCR method and hr-HPV DNA was found positive in 11.2% of the patients. The most common HPV type was one of the other hr-HPV subtypes with a frequency of 66.6%, while HPV types 16 and 18 were detected with a frequency of 16.6% and multiple HPV DNA positivity was detected with a frequency of 6.6%.

When examined according to age groups, HPV DNA positivity was most frequently observed in patients aged 24 and under (16.7%), while it was second most frequently observed in the patient population aged 55 and over (13.9%). While any epithelial cell dysplasia was detected in 10.7% of all patients in cytopathological examinations, the rate of cytopathological abnormality detection in the HPV DNA positive group was found to be 43.3%.

While the rate of seropositivity development in the presence of HPV infection was reported as approximately 50% in studies conducted, this rate was found to be 4.2% in our study. It was thought that the low seropositivity was due to the random selection of the study group and the disregard of the patients' complaints and clinical findings. While hr-HPV DNA positivity was 47% in patients with HPV IgG detected in serum, the rate of cytopathological abnormality in this patient group was 23.5%.

In conclusion; the existence of a long preinvasive process in cervical cancer shows the importance of screening programs. Especially in patients in the sexually active age group, PCR methods are fast, easy and reliable methods for screening HPV and determining the appropriate clinical approach and protection strategies. However, it was concluded that the application of

serological tests in addition to molecular methods, especially in high-risk patient groups, will be guiding in terms of planning protection and vaccination strategies and patient follow-up programs in the precancerous process more effectively. More comprehensive studies are needed to determine the prevalence and distribution of HPV types and serological profiles.

Keywords: HPV, HPV DNA, cervical cancer, HPV IGG antibody, ELISA

EK 1: Servikal smear için bilgilendirilmiş gönüllü onam formu

ÇALIŞMANIN ADI: JİNEKOLOJİ HASTALARINDA HPV DNA SONUÇLARI İLE SERUM HPV IGG ANTİKOR DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağının çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirseniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Eğer isterseniz, bu çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Çalışma amacıyla yapılan normal muayeneniz sırasında istenilen tetkikleriniz dışındaki tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyicisi tarafından karşılanacak; size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI:

Servikal kanser ve genital bölgenin prekanseröz lezyonları dünya çapında kadın sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardandır. Serviks kanseri ve displazisinde primer etyolojik ajan İnsan Papillomavirüsleridir (HPV). Ayrıca HPV tüm dünyada cinsel yolla bulaşan hastalık etkenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. HPV'nin yol açtığı lezyonlar genellikle lokalize olup kendiliğinden iyileşirken özellikle cinsel yönden aktif dönemde sessiz, latent infeksiyonlar şeklinde izlenebilir. HPV'nin insanlarda siğil ve papillomlar gibi düşük malignite potansiyeli olan benign hiperplaziler yanında birçok farklı bölgede malign epitelyal ve mukozal lezyonlara da neden olduğu bilinmektedir. HPV'lerin kanseröz lezyonlarla ilişkili olduğu gösterilen alt grubu "yüksek-riskli" HPV'ler olarak adlandırılır ve bu grupta onkojenik potansiyeli en yüksek olan HPV tip 16 ve HPV tip 18'dir.

Enfeksiyondan korunmada temel yol cinsel partner sayısının azaltılması, sünnet, kondom kullanılması, aşılama gibi bireysel korunma yöntemlerine ek

olarak mevcut enfeksiyonların erken tanı ve tedavisi de sessiz enfeksiyonların önlenmesi açısından önemlidir. Bu nedenle kadın sağlığı açısından bu denli önemli bir enfeksiyon ajanı ile mücadelede cinsel aktivite çağındaki 18-65 yaş aralığındaki kadın bireylerde mevcut enfeksiyonun tanısı ve hastalığın toplumdaki seroprevalansıyla ilgili verilerinin toplanması enfeksiyon ile mücadelede ciddi önem taşımaktadır.

YÖNTEM:

Bu çalışmada Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Jinekoloji polikliniğine başvuran ve yapılan muayenesi neticesinde servikal smear ile HPV DNA çalışılması planlanan hastaların serum örneklerinden ELISA yöntemi kullanılarak HPV IGG antikor varlığının araştırılması planlanmıştır. Böylece herhangi bir nedenle kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvuran 18-65 yaş arası kadın hastalarda mevcut HPV enfeksiyonunun ve olası latent enfeksiyonun erken teşhis ve tedavisi sağlanmış olacaktır. Kadın kanserlerinin en önemli enfeksiyöz etkenlerinden olan HPV enfeksiyonunun toplum seroprevalansının belirlenmesi ile toplumsal olarak hastalıkla mücadelede en önemli basamak olan aşılama programlarının yaygınlaştırılması sağlanabilecektir. Moleküler tanı laboratuvarına gönderilen servikal smear örneklerinde real time PCR yöntemi kullanılarak HPV DNA varlığı araştırılacaktır. Seroloji laboratuvarına gönderilen serum örneklerden ise ELISA (Enzyme-Linked ımmünosorbent assays) yöntemi kullanılarak HPV IGG antikor varlığı araştırılacaktır. Çalışma için alınan kan örneği rutin kan tetkikleri için açılan venöz damar yolundan alınacaktır. Hastaya bu çalışma için ek bir girişimsel işlem yapılmayacaktır.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Jinekoloji polikliniğine başvuran 18-65 yaş arası kadın hastalardan servikal smear örneği alınan hastalar çalışmaya dahil edilecektir. Hastaların smear örneklerinde PCR yöntemiyle HPV DNA çalışılacak ve HPV tip tayini yapılacaktır. Rutin kan testleri için açılan venöz damar yolundan 5 ml kan örneği alınacaktır. Kan alma işlemi için ilave bir damar yolu açılmayacak ve hastaya ek bir girişim

uygulanmayacaktır. Kan alma işleminin ve smear testinin hasta için oluşturacağı lokal kanama, ağrı, hassasiyet ve kanama gibi yan etkiler dışında işlem hasta için herhangi bir risk taşımamaktadır.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

İnsan papillomavirüs enfeksiyonları, başta kadınlarda rahim ağzı kanseri olmak üzere her iki cinsiyette birçok farklı organ ve sistemde benign ve malign lezyonlarının gelişiminden sorumludur. Ayrıca tüm dünyada en sık görülen cinsel yolla bulaşan hastalık etkenlerinin başında yer alır. Özellikle cinsel aktif yaş grubu olan 18-65 yaş arası bireylerde enfeksiyonun latent olarak seyredebilmesi ve cinsel yolla yayılımının hızlı olması nedeniyle erken tanı ve tedavi ciddi önem taşımaktadır. Ayrıca toplumdaki seroprevalansın belirlenmesi aşılama programlarının yaygınlaştırılması ve toplumsal eğitim ve sağlık politikalarının şekillenmesi açısından önemlidir.

Bu çalışma ile 18-65 yaş aralığındaki kadın bireylerde serumda HPV antikor düzeylerinin belirlenmesi ve enfeksiyonun bu yaş grubu kadınlardaki sıklığının daha net olarak ortaya konması planlanmıştır. Bu şekilde olası akut veya latent enfeksiyonun tedavisi erken dönemde sağlanarak uzun vadede olası malign süreçlerin önüne geçilmesi planlanmaktadır. Bu şekilde hem bireysel hem de ülke ekonomisi açısından yüksek sağlık giderlerinin azaltılması mümkün olacaktır. Ayrıca hastalığı bağlı endişe, kaygı, depresyon gibi psikolojik sorunlar azaltılmış olacaktır. Toplumsal olarak da eğitim ve aşılama programlarının yaygınlaştırılması ile enfeksiyon ile mücadelede önemli ilerleme sağlanacağı öngörülmektedir.

GÖNÜLLÜYE UYGULANACAK İŞLEMLERİN OLASI ZARARLARI NELERDİR?

Çalışma için gönüllüden servikal smear örneği ve venöz kan örneği alınacaktır. Hasta açısından ek risk oluşturacak herhangi bir girişimsel işlem uygulanmayacaktır.

Toplumda özel hasta grubunu oluşturan, bebek ve çocuklar, gebelik, lohusalık, emzirme ya da immün supresif durumu olan hasta grupları

çalışmaya dahil edilmeyecektir. Çalışmaya katılan hastalara rutin yapılan tetkikler haricinde girişimsel bir işlem uygulanmayacaktır.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Çalışmaya katılan hastaların bilgileri saklı tutulacak ve kişisel bilgiler hiçbir ortamda paylaşılmayacaktır. Çalışma için toplanan kan örnekleri çalışma bittikten sonra imha edilecektir ve herhangi başka bir çalışmada kullanılmayacaktır.

SORU VE PROBLEMLER İÇİN BAŞVURULACAK KİŞİLER:

Dr. Gülsüm EKİM

Prof. Dr. Kenan DEĞERLİ

Çalışmaya Katılma Onayı

Yukarıdaki bilgileri doktorumla ayrıntılı olarak tartıştım ve kendisi bütün sorularımı cevapladı. Bu bilgilendirilmiş olur belgesini okudum ve anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyor ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllü Adı Soyadı:		*Tarih ve İmza:*
Adres ve Telefon:		

Tanık[1] Adı Soyadı:		*Tarih ve İmza:*
Adres ve Telefon:		

Araştırmacı[2] Adı Soyadı:		*Tarih ve İmza:*
Adres ve Telefon:		

1: Gönüllünün bilgilendirilme işlemine başından sonuna dek tanıklık eden kişi

2: Gönüllüyü araştırma hakkında bilgilendiren kişi

KAYNAKLAR

1. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):215-222. doi:10.1128/CMR.05028-11

2. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-527. doi:10.1056/NEJMoa021641

3. Pandhi D, Sonthalia S. Human papilloma virus vaccines: Current scenario. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2011;32(2):75-85. doi:10.4103/0253-7184.85409

4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660

5. Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res*. 2009;88(4):307-317. doi:10.1177/0022034509333446

6. Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2007;111(1):1-14. doi:10.1002/cncr.22425

7. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci*. 2004;50(1-2):9-19.

8. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine*. 2012;30: F12-F23. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.055

9. Syrjänen K. Mechanisms and predictors of high-risk human papillomavirus (HPV) clearance in the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2007;28(5):337-351.

10. Sharma S, Munger K. The Role of Long Noncoding RNAs in Human Papillomavirus-associated Pathogenesis. *Pathogens*. 2020;9(4). Doi:10.3390/pathogens9040289

11. Cheng YW, Wu MF, Wang J, et al. Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res*. 2007;67(22):10686-10693. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1461

12. Syrjänen S, Syrjänen K. The history of papillomavirus research. *Cent Eur J Public Health*. 2008;16 Suppl: S7-13. doi:10.21101/cejph. B0040

13. Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(11):2006-2011. Doi: 10.1016/j.biocel.2007.07.004

14. zur Hausen H. Papillomaviruses--to vaccination and beyond. *Biochem Biokhimiia*. 2008;73(5):498-503. doi:10.1134/s0006297908050027

15. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers- a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-265. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.046

16. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 1: S1-15. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.09.054

17. Skoulakis A, Fountas S, Mantzana-Peteinelli M, Pantelidi K, Petinaki E. Prevalence of human papillomavirus and subtype distribution in male partners of women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a systematic review. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):192. doi:10.1186/s12879-019-3805

18. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(7):453-459. doi:10.1016/S1473-3099(07)70158-5

19. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108. doi:10.3322/canjclin.55.2.74

20. Rodríguez-Álvarez MI, Gómez-Urquiza JL, Husein-El Ahmed H, Albendín-García L, Gómez-Salgado J, Cañadas-De la Fuente GA. Prevalence and Risk Factors of Human Papillomavirus in Male Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(10):2210. Doi:10.3390/ijerph15102210

21. Goldstone S, Palefsky JM, Giuliano AR, et al. Prevalence of and risk factors for human papillomavirus (HPV) infection among HIV-seronegative men who have sex with men. *J Infect Dis*. 2011;203(1):66-74. doi:10.1093/infdis/jiq016

22. Kombe AJ, Li B, Zahid A, et al. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Front Public Health*. 2021; 8:552028. Doi:10.3389/fpubh.2020.552028

23. Ergünay K, Misirlioğlu M, Firat P, et al. [Detection and typing of human papilloma virus by polymerase chain reaction and hybridization assay in cervical samples with cytological abnormalities]. *Mikrobiyol Bul*. 2008;42(2):273-282.

24. Dura MC, Aktürk H, Aslan Ö, Yıldız Ş, Kefeli M, Çelik H. Human Papillomavirus Infection (HPV) Prevalence in the Black Sea Region of Turkey: Primary HPV Screening for Cervical Cancer. *Cureus*. 2024;16(1): e52615. Doi:10.7759/cureus.52615

25. Tanriverdi EÇ. Relation of Cervical Cancer with the Results of Human Papillomavirus (HPV) Screening Carried out via Hybrid Capture 2 Method

on 52.000 Women in Erzurum. *Mikrobiyol Bul*. Published online January 1, 2018. Accessed June 10, 2024.

26. Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch Med Res*. 2008;39(2):189-197. doi: 10.1016/j.arcmed.2007.08.003

27. Gillison ML. Human papillomavirus-related diseases: oropharynx cancers and potential implications for adolescent HPV vaccination. *J Adolesc Health Off Publ Soc Adolesc Med*. 2008;43(4 Suppl): S52-60. doi: 10.1016/j.jadohealth.2008.07.002

28. Corbalán-Vélez R, Ruiz-Maciá JA, Brufau C, Carapeto FJ. [Cutaneous squamous cell carcinoma and human papillomavirus]. *Actas Dermosifiliogr*. 2007;98(9):583-593.

29. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):1-17. doi:10.1128/CMR.16.1.1-17.2003

30. Koç FU, and Kurugöl Z. Human papillomavirüs epidemiyolojisi. Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi. 2012; 17(1): 9-12.

31. Bosch FX, de Sanjose S, and Castellsague X. Understanding the Origin of Cervical Cancer. In: Prediville W, Davies P. Editors. The Health Professional's HPV Handbook. UK: Taylor and Francis Group; 2004:41-54.

32. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1: S16-24. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.008

33. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. 2010;11(8):781-789. doi:10.1016/S1470-2045(10)70017-6

34. Li S, Ni XB, Xu C, Wang XH, Zhang C, Zeng XT. Oral sex and risk of oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *J Evid-Based Med*. 2015;8(3):126-133. doi:10.1111/jebm.12159

35. Ryndock EJ, Meyers C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(10):1165-1170. Doi:10.1586/ 14787210.2014.959497

36. Hahn HS, Kee MK, Kim HJ, et al. Distribution of maternal and infant human papillomavirus: risk factors associated with vertical transmission. *Eur J Obstet* Gynecol Reprod Biol. 2013;169(2):202-206. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.02.024

37. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Virol J*. 2008; 5:106. doi:10.1186/1743-422X-5-106

38. Ma STC, Yeung AC, Chan PKS, Graham CA. Transvaginal ultrasound probe contamination by the human papillomavirus in the emergency department. *Emerg Med J EMJ*. 2013;30(6):472-475. doi:10.1136/ emermed-2012-201407

39. Casalegno J sebastien, Le Bail Carval K, Eibach D, et al. High risk HPV contamination of endocavity vaginal ultrasound probes: an underestimated route of nosocomial infection? *PloS One*. 2012;7(10): e48137. Doi: 10.1371/journal.pone.0048137

40. Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2002;16(3):231-240. doi:10.1046/j.1473-2165.2002.00419.x

41. Pfisher H. Virology and Pathogenesis. In: Pfisher H. Eds. Prophylaxis and Early Detection of HPV-Related Neoplasia, 1st Ed., Germany: Karger, 2012:1-11.

42. Alp Avcı G. İnsan Papillomavirusunun Genomik Yapısı ve Proteinleri. Mikrobiyol Bul. 2012; 46(3): 507–15.

43. Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial

neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol*. 2008;39(2):154-166. doi: 10.1016/j.humpath.2007.11.002

44. D'Abramo CM, Archambault J. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein- protein interactions. *Open Virol J*. 2011; 5:80-95. doi:10.2174/1874357901105010080

45. Egawa N, Nakahara T, Ohno SI, et al. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol*. 2012;86(6):3276-3283. Doi:10.1128/JVI.06450-11

46. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 2006;16(2):83-97. doi:10.1002/rmv.488

47. Cai Q, Lv L, Shao Q, Li X, Dian A. Human papillomavirus early proteins and apoptosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;287(3):541-548. doi:10.1007/s00404-012-2665-z

48. Lou Z, Wang S. E3 ubiquitin ligases and human papillomavirus-induced carcinogenesis. *J Int Med Res*. 2014;42(2):247-260. doi:10.1177/ 0300060513506655

49. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2004;68(2):362-372. doi:10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004

50. Ding Q, Li L, Whyte P. Human papillomavirus 18 E1^E4 protein interacts with cyclin A/CDK 2 through an RXL motif. *Mol Cell Biochem*. 2013;373(1-2):29-40. doi:10.1007/s11010-012-1472-y

51. Venuti A, Paolini F, Nasir L, et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer*. 2011; 10:140. doi:10.1186/1476-4598-10-140

52. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2006;110(5):525-541. doi:10.1042/CS20050369

53. Köse MF, Turan T ve Naki MM. Human Papillomavirüs Ile Ilişkili Hastalıklar. Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi. 2012; 17(1): 22-33.

54. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*. 1998;396(6706):84-88. doi:10.1038/23962

55. Stubenrauch F, Hummel M, Iftner T, Laimins LA. The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol*. 2000;74(3):1178-1186. Doi:10.1128/jvi.74.3.1178-1186.2000

56. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27. doi: 10.1016/j.virol.2004. 03.033

57. Nakao S, Mori S, Kondo K, Matsumoto K, Yoshikawa H, Kanda T. Monoclonal antibodies recognizing cross-neutralization epitopes in human papillomavirus 16 minor capsid protein L2. *Virology*. 2012;434(1):110-117. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.006

58. Bergant Marušič M, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP, Banks L. Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. Traffic Cph Den. 2012;13(3):455-467. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01320.x

59. Badur S. Human papillomavirüs: virolojik ve immünolojik özellikleri. Flora Infeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi.2012; 17(1):1-8.

60. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. 2005;32 Suppl 1: S1-6. doi: 10.1016/j.jcv.2004.10.021

61. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, and Morse SA. Papillomavirus'lar. Çeviri Editörü: Yenen Oğ, Lange,1.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2009: 597-600.

62. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70-79. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002

63. White EA, Howley PM. Proteomic approaches to the study of papillomavirus-host interactions. *Virology*. 2013;435(1):57-69. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.046

64. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5: F55-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083

65. Paolini F, Rizzo C, Sperduti I, et al. Both mucosal and cutaneous papillomaviruses are in the oral cavity but only alpha genus seems to be associated with cancer. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2013;56(1):72-76. doi: 10.1016/j.jcv.2012.09.016

66. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;89(1):101-105. doi: 10.1038/sj.bjc.6601024

67. La Rosa G, Fratini M, Accardi L, et al. Mucosal and cutaneous human papillomaviruses detected in raw sewages. *PloS One*. 2013;8(1): e52391. Doi: 10.1371/journal.pone.0052391

68. Giuliani L, Favalli C, Syrjanen K, Ciotti M. Human papillomavirus infections in lung cancer. Detection of E6 and E7 transcripts and review of the literature. *Anticancer Res*. 2007;27(4C):2697-2704.

69. Gheit T. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. *Front Oncol*. 2019; 9:355. doi:10.3389/fonc.2019.00355

70. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol*. 2012; 3:152. doi:10.3389/fmicb. 2012.00152

71. Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, et al. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2013; 2013:540850. Doi:10.1155/2013/540850

72. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*. 2002;21(18):4754-4762. Doi:10.1093/emboj/cdf494

73. Liu J, Thorp SC. Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. *Med Res Rev*. 2002;22(1):1-25. doi:10.1002/med.1026

74. Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*. 1993;67(12):6929-6936. Doi:10.1128/JVI.67.12.6929-6936.1993

75. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. 1991;185(1): 251-257.doi:10.1016/0042-6822(91)90772-4

76. Hofmann KJ, Cook JC, Joyce JG, et al. Sequence determination of human papillomavirus type 6'a and assembly of virus-like particles in Saccharomyces cerevisiae. *Virology*. 1995;209(2):506-518. doi:10.1006/viro.1995.1283

77. Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, et al. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol*. 1996;70(9):5875-5883. Doi:10.1128/JVI.70.9.5875-5883.1996

78. Fligge C, Schäfer F, Selinka HC, Sapp C, Sapp M. DNA-induced structural changes in the papillomavirus capsid. *J Virol*. 2001;75(16):7727-7731. Doi:10.1128/ JVI.75.16.7727-7731.2001

79. Raff AB, Woodham AW, Raff LM, et al. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol*. 2013;87(11):6062-6072. Doi:10.1128/JVI.00330-13

80. McBride AA, Oliveira JG, McPhillips MG. Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell Cycle Georget Tex*. 2006;5(14):1499-1502. Doi:10.4161/cc.5.14.3094

81. Yarkın F ve Vardar MA. HPV immünolojisi ve doğal enfeksiyonlar. Turkiye Klinikleri Gynecology Obstetrics-Special Topics, 2009;2(1), 43-47.

82. Tuncer ZS. Jinekolojik açıdan human papilloma virus infeksiyonu. Hacettepe Tıp Dergisi. 2007; 38: 8-14.

83. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Papilloma ve Polyomavirüsler. Bölüm 6 İç: Tıbbi Mikrobiyoloji 6. Baskı, Eds. Başustaoğlu AC. Çeviri Ed. Ankara: Atlas Kitapçılık 2010: S 499-507.

84. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*. 2003;22(8):1225-1237. Doi: 10.1038/sj.onc.1206170

85. 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.

86. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer. 2007;7(1):11-22. doi: 10.1038/nrc 2050

87. Stanley M, Gissmann L, Nardelli-Haefliger D. Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination- implications for second generation vaccines. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10: K62-67. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.05.066

88. Tuncer S. İnsan Papillomavirusları. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999:797-802.

89. Workowski KA, Bolan GA, Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines,2015.*MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep*. 2015;64(RR-03):1-137.

90. Parkin DM, Almonte M, Bruni L, Clifford G, Curado MP, Piñeros M. Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 11: L1-15. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.05.043

91. Cardoso JC, Calonje E. Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: a review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2011;20(3):145-154.

92. Proietti I, Skroza N, Bernardini N, et al. Acitretin in management of diffuse common warts: a case report. *Dermatol Ther*. 2011;24(6):581-583. doi:10.1111/j.1529-8019.2012.01408.x

93. Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, Orth G, Favre M. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. Nat Genet. 2002;32(4):579-581. doi:10.1038/ng1044

94. Zampetti A, Giurdanella F, Manco S, et al. Acquired epidermodysplasia verruciformis: a comprehensive review and a proposal for treatment. *Dermatol* Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al. 2013;39(7):974-980. doi:10.1111/ dsu.12135

95. Patel H, Wagner M, Singhal P, Kothari S. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infect Dis*. 2013; 13:39. doi:10.1186/1471-2334-13-39

96. Petry KU, Luyten A, Justus A, et al. Prevalence of low-risk HPV types and genital warts in women born 1988/89 or 1983/84 -results of WOLVES, a population-based epidemiological study in Wolfsburg, Germany. *BMC Infect Dis*. 2012; 12:367. doi:10.1186/1471-2334-12-367

97. Handley JM, Maw RD, Lawther H, Horner T, Bharucha H, Dinsmore WW. Human papillomavirus DNA detection in primary anogenital warts and cervical low-grade intraepithelial neoplasias in adults by in situ hybridization. *Sex Transm Dis*. 1992;19(4):225-229. doi:10.1097/00007435-199207000-00008

98. O'Mahony C, Gomberg M, Skerlev M, et al. Position statement for the diagnosis and management of anogenital warts. J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV. 2019;33(6):1006-1019. Doi:10.1111/jdv.15570

99. Monk BJ, Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol*. 2007;107(2 Suppl 1): S6-13. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.07.076

100. Ye Y, Sun XZ, Feng JS. Woman with rectal condyloma acuminatum: a case report. Int J Clin Exp Med. 2015;8(4):6365-6368.

101. O'Brien WM, Jenson AB, Lancaster WD, Maxted WC. Human papillomavirus typing of penile condyloma. *J Urol*. 1989;141(4):863-865. doi:10.1016/s0022-5347(17)41034-2

102. Nielson CM, Flores R, Harris RB, et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2007;16(6):1107-1114. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0997

103. Derkay CS, Wiatrak B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *The Laryngoscope*. 2008;118(7):1236-1247. Doi:10.1097/MLG.0b013e31816a7135

104. Larson DA Derkay CS. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*.2010;118(6-7): 450-454. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02619.x

105. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*. 2007;57(1):43-66. doi:10.3322/canjclin.57.1.43

106. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet Lond Engl*. 2007;370(9590):890-907. doi:10.1016/S0140-6736(07)61416-0

107. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual veri on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2007;120(4):885-891. doi:10.1002/ijc.22357

108. Low EL, Simon AE, Lyons J, Romney-Alexander D, Waller J. What do British women know about cervical cancer symptoms and risk factors? *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2012;48(16):3001-3008. Doi: 10.1016/j.ejca 2012. 05.004

109. Ağaçfidan A, Erturan Z. Human Papillomaviruslar. XXXIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı, Bodrum, 21-25 Ekim 2008: 313-337.

110. Wang KL. Human papillomavirus and vaccination in cervical cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007;46(4):352-362. doi:10.1016/S1028-4559(08)60004-2

111. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı. Rahim Ağzı (Serviks) Kanseri. Erişim adresi: https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-turleri/kanser-turleri/kanser-dairesi baskanligi

112. Dim CC. Towards improving cervical cancer screening in Nigeria: a review of the basics of cervical neoplasm and cytology. *Niger J Clin Pract*. 2012;15(3):247-252. doi:10.4103/1119-3077.100615

113. Uronis HE, Bendell JC. Anal cancer: an overview. *The Oncologist*. 2007;12(5):524-534. doi:10.1634/theoncologist.12-5-524

114. Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, Berline J, Ahn DK, Greenspan JS. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res*. 1991;51(3):1014-1019.

115. Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği. Anal Kanserler. Erişim Adresi: Https://Www.Tkrcd.Org.Tr/Anal-Kanser2. Erişim Tarihi: 23.02.2022.

116. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*. 2012;13(6):607-615. doi:10.1016/S1470-2045(12)70137-7

117. Ramet J, van Esso D, Meszner Z, European Academy of Paediatrics Scientific Working Group on Vaccination. Position paper--HPV and the primary prevention of cancer; improving vaccine uptake by paediatricians. *Eur J Pediatr*. 2011;170(3):309-321. doi:10.1007/s00431-010-1265-9

118. Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, Cullen KJ. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(1):57-81. doi:10.3322/caac.21167

119. Nogues JC, Fassas S, Mulcahy C, Zapanta PE. Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer. *J Am Board Fam Med JABFM*. 2021;34(4):832-837. doi:10.3122/jabfm.2021.04.200588

120. Şahiner F, Şener K. Human Papilloma Virus Enfeksiyonları, Risk Faktörleri ve Koruyucu Önlemler. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni 2013; 12(6): 715-22.

121. Ergünay K (Editör). İnsan Papillomavirusları. Kısım 2, Bölüm 20 İç: Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, Ergünay K, Us AD. Eds. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara, 2011: S 591-605.

122. Villa LL, Denny L. CHAPTER 7 Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. 2006;94 Suppl 1: S71-S80. doi:10.1016/S0020-7292(07)60013-7

123. Hoffman BL, Schorge JO, Bradshaw KD, Halvorson LM, Schaffer JI, Corton MM. Williams Gynecology, Fourth Edition. McGraw Hill Professional; 2020.

124. Brown AJ, Trimble CL. New technologies for cervical cancer screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012;26(2):233-242. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2011. 124.11.001

125. Follen M, Richards-Kortum R. Emerging technologies and cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(5):363-365. doi:10.1093/jnci/92.5.363

126. Karasu AFG, Adanir I, Aydin S, Ilhan GK, Ofli T. Nurses' Knowledge and Opinions on HPV Vaccination: a Cross-Sectional Study from Istanbul. *J Cancer Educ Off J Am Assoc Cancer Educ*. 2019;34(1):98-104. doi:10.1007/s13187-017-1272-x

127. Lambert PF, Collins A. Papillomaviruses: Molecular Biology of Human Viruses.In: Elsevier; 2008:18-26. doi:10.1016/B978-012374410-4.00458-1

128. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1: S43-51. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.004

129. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*. 2000;181(6):1911-1919. Doi:10.1086/ 315498

130. Luevano M, Bernard HU, Barrera-Saldaña HA, et al. High-throughput profiling of the humoral immune responses against thirteen human papillomavirus types by proteome microarrays. *Virology*. 2010;405(1):31-40. doi: 10.1016/j.virol.2010.05.011

131. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127(8):940-945. doi:10.5858/2003-127-940-HPTM

132. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers*. 2009;24(4):215-222. doi:10.1177/172460080902400401

133. Venuti A, Paolini F. HPV detection methods in head and neck cancer. *Head Neck Pathol*. 2012;6 Suppl 1(Suppl 1): S63-74. doi:10.1007/s12105-012-0372-5

134. Kumaraswamy KL, Vidhya M. Human papilloma virus and oral infections: an update. *J Cancer Res Ther*. 2011;7(2):120-127. doi:10.4103/0973-1482.82915

135. Cox JT. Human papillomavirus testing in primary cervical screening and abnormal Papanicolaou management. *Obstet Gynecol Surv*. 2006;61(6 Suppl 1): S15-25. doi: 10.1097/01.ogx.0000221011.01750.25

136. Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol J*. 2012; 9:262. doi:10.1186/1743-422X-9-262

137. Denny LA, Wright TC. Human papillomavirus testing and screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2005;19(4):501-515. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2005.02.004

138. Handricks DA Comanor L. Signal amplifi cation-based techniques, pp: 19-64. In: Lorincz A (ed), Nucleic Acid Testing for Human Disease. 2006. CRC/Taylor & Francis, New York.

139. Hogarth S, Hopkins MM, Rodriguez V. A molecular monopoly? HPV testing, the Pap smear and the molecularisation of cervical cancer screening in the USA. *Sociol Health Illn*. 2012;34(2):234-250. doi:10.1111/j.1467-9566.2011.01411.x

140. Nishino HT,Tambouret RH, Wilbur DC.Testing for human papillomavirus in cervical cancer screening: a review of indications and methodology. *Cancer Cytopathol*. 2011;119(4):219-227. doi:10.1002/cncy.20161

141. Takács T, Jeney C, Kovács L, Mózes J, Benczik M, Sebe A. Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *J Virol Methods*. 2008;149(1):153-162. doi: 10.1016/j. jviromet. 2007.12.009

142. Şahiner F, Kubar A, Yapar M, Şener K, Dede M, Gümral R. Detection of major HPVs by a new multiplex real-time PCR assay using type-specific primers. *J Microbiol Methods*. 2014; 97:44-50. doi: 10.1016/j.mimet.2013. 12.012

143. Lee JH, Lee NW, Hong SW, Nam YS, Choi JW, Kim YS. Establishment of an efficient multiplex real-time PCR assay for human papillomavirus genotyping in cervical cytology specimens: comparison with hybrid capture II. *Cytopathol Off J Br Soc Clin Cytol*. 2011;22(4):261-268. doi:10.1111/j.1365-2303.2010.00787.x

144. Dutra I, Foroni I, Couto AR, Lima M, Bruges-Armas J. Molecular Diagnosis of Human Papillomavirus, Pp: 203-46. In: Vanden Broeck D (Ed), Human Papillomavirus and Related Diseases- From Bench to Bedside-Research Aspects. 2012, InTech, Rijeka, Croatia.

145. Van Doorn LJ, Kleter B, Quint WG. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev Mol Diagn*. 2001;1(4):394-402. doi:10.1586/ 14737159.1. 4.394

146. Gheit T, Landi S, Gemignani F, et al. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):2025-2031. Doi:10.1128/JCM.02305-05

147. Sandri MT, Lentati P, Benini E, et al. Comparison of the Digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):2141-2146. Doi:10.1128/JCM.00049-06

148. Wang ZH, Kjellberg L, Abdalla H, et al. Type specificity and significance of different isotypes of serum antibodies to HPV capsids.*J InfectDis*.2000;181(2):456-462. doi:10.1086/ 315232

149. Mestecky J, Moldoveanu Z, Russell MW. Immunologic uniqueness of the genital tract: challenge for vaccine development. Am J Reprod Immunol N Y N 1989. 2005;53(5):208-214. doi:10.1111/j.1600-0897.2005.00267.x

150. Feng Q, Cherne S, Winer RL, et al. Development and evaluation of a liquid bead microarray assay for genotyping genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):547-553. doi:10.1128/JCM. 01707-08

151. Russell MW, Mestecky J. Tolerance and protection against infection in the genital tract. *Immunol Invest*. 2010;39(4-5):500-525. doi:10.3109/ 08820131003674834

152. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 1: S16-22. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.09.002

153. Antonsson A, Green AC, Mallitt K ann, et al. Prevalence and stability of antibodies to 37 human papillomavirus types-a population-based longitudinal study. *Virology*. 2010;407(1):26-32. doi: 10.1016/j.virol. 2010. 07.046

154. Lindelöf B, Sigurgeirsson B, Gäbel H, Stern RS. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol*. 2000;143(3):513-519.

155. Proby CM, Harwood CA, Neale RE, et al. A case-control study of betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma in organ transplant recipients. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2011;11(7):1498-1508. Doi:10.1111/j.1600-6143. 2011.03589.x

156. Dillner J. The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol*. 1999;9(6):423-430. doi:10.1006/scbi.1999.0146

157. Hamsíková E, Ludvíková V, Smahel M, Sapp M, Vonka V. Prevalence of antibodies to human papillomaviruses in the general population of the Czech Republic. *Int J Cancer*. 1998;77(5):689-694. doi:10.1002/1097

158. Dillner J, Kallings I, Brihmer C, et al. Seropositivities to human papillomavirus types 16, 18, or 33 capsids and to Chlamydia trachomatis are markers of sexual behavior. *J Infect Dis*. 1996;173(6):1394-1398. Doi:10.1093/infdis/173.6.1394

159. Rubenstein LM, Smith EM, Pawlita M, Haugen TH, Hamšíková E, Turek LP. Human papillomavirus serologic follow-up response and relationship to survival in head and neck cancer: a case-comparison study. *Infect Agent Cancer*. 2011; 6:9. doi:10.1186/1750-9378-6-9

160. Koslabova E, Hamsikova E, Salakova M, et al. Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *Int J Cancer*. 2013;133(8):1832-1839. Doi:10.1002/ijc.28194

161. Zhang Y, Waterboer T, Haddad RI, et al. Human papillomavirus (HPV) 16 antibodies at diagnosis of HPV-related oropharyngeal cancer and antibody trajectories after treatment. *Oral Oncol*. 2017; 67:77-82. doi: 10.1016/j.oraloncology. 2017.02.004

162. Akcali S, Goker A, Ecemis T, Kandiloglu AR, Sanlidag T. Human papilloma virus frequency and genotype distribution in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2013;14(1):503-506. doi:10.7314/apjcp.2013.14.1.503

163. Beka H, Önel M, Önel D, et al. Jinekoloji kliniğine başvuran kadınlarda HPV DNA'nın Nükleik Asit Hibridizasyon yöntemi ile araştırılması. Accessed December 9, 2024. https://avesis.istanbul.edu.tr/yayin/72ec1399 -aea0-44e2-bf05-38392c2e9670

164. Ozçelik B, Serin IS, Gökahmetoğlu S, Başbuğ M, Erez R. Human papillomavirus frequency of women at low risk of developing cervical cancer: a preliminary study from a Turkish university hospital. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2003;24(2):157-159.

165. Oztürk S, Kaleli I, Kaleli B, Bir F. [Investigation of human papillomavirus DNA in cervical specimens by hybrid capture assay]. *Mikrobiyol Bul*. 2004;38(3):223-232.

166. Ağaçfidan A, Beka H, Önel M, Bilgin M, Önel D, Badur S. Kadınlarda HPV ve Chlamydia trachomatis araştırılması. Accessed December 9, 2024. https://avesis.istanbul.edu.tr/yayin /e46b29b4 -8574-4cfc-b799-ddfccabecdba

167. Gultekin M, Zayifoglu Karaca M, Kucukyildiz I, et al. Initial results of population based cervical cancer screening program using HPV testing in one million Turkish women. *Int J Cancer*. 2018;142(9):1952-1958. Doi:10.1002/ijc.31212

168. Serin S, Denizli R, Sakin Ö, Pirimoğlu ZM. Genital siğili olan kadınlarda servikal HPV ve servikal smear sonuçlarının karşılaştırılması. *Med J Süleyman Demirel Univ*. 2020;27(3):283-287. doi:10.17343/ sdutfd.569556

169. Rassu M, Bertoloni G, Mengoli C, Peron A, Benedetti P, Palu' G. HPV genotype prevalence in cervical specimens with abnormal cytology: A report from north-east Italy. *Scand J Infect Dis*. 2005;37(6-7):476-481. doi:10.1080/00365540510036633

170. Beerens E, Van Renterghem L, Praet M, et al. Human papillomavirus DNA detection in women with primary abnormal cytology of the cervix: prevalence and distribution of HPV genotypes. *Cytopathol Off J Br Soc Clin Cytol*. 2005;16(4):199-205. doi:10.1111/j.1365-2303.2005.00266.x

171. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, et al. Prevalence of HPV infection among females in the US. *JAMA*. 2007;297(8):813-819. doi:10.1001/jama. 297.8.813

172. Sowjanya AP, Jain M, Poli UR, et al. Prevalence and distribution of high-risk human papilloma virus (HPV) types in invasive squamous cell carcinoma of the cervix and in normal women in Andhra Pradesh, India. *BMC Infect Dis*. 2005; 5:116. doi:10.1186/1471-2334-5-116

173. Sánchez-Anguiano LF, Alvarado-Esquivel C, Reyes-Romero MA, Carrera-Rodríguez M. Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes. *BMC Infect Dis*. 2006; 6:27. doi:10.1186/1471-2334-6-27

174. Nyári TA, Kalmár L, Deák J, Szõllõsi J, Farkas I, Kovács L. Prevalence and risk factors of human papilloma virus infection in asymptomatic women in southeastern Hungary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;115(1):99-100. doi:10.1016/ j.ejogrb. 2003.10.003

175. Yerlikaya H, Orak F, Aral M, et al. Servikal Örneklerde Human Papillomavirüs Genotiplendirme ve Sitopatoloji Sonuçlarının Değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Derg*. 2023; 50(2):235-244. doi:10.5798/dicletip.1313386

176. Aydemir Ö, Terzi HA, Köroğlu M, Turan G, Altındiş M, Karakeçe E. Servikal örneklerde HPV-DNA Pozitiflik Oranı ve Sitopatolojik Sonuçların Değerlendirilmesi. *Türk Hij ve Deney Biyol Derg*. 2020;77(1):33-40.

177. Fakhry C, Qualliotine JR, Zhang Z, et al. Serum Antibodies to HPV16 Early Proteins Warrant Investigation as Potential Biomarkers for Risk Stratification and Recurrence of HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Cancer Prev Res Phila Pa*. 2016; 9(2):135-141. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0299

178. Lang Kuhs KA, Kreimer AR, Trivedi S, et al. Human papillomavirus 16 E6 antibodies are sensitive for human papillomavirus-driven oropharyngeal cancer and are associated with recurrence. *Cancer*. 2017;123(22):4382-4390. Doi:10.1002/cncr. 30966