

# HUMAN PAPİLLOMAVİRUS GENOTİPLERİNİN PYROSEQUENCİNG METODU İLE TESPİTİ

## DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS GENOTYPES BY PYROSEQUENCING METHOD

Serap Özen<sup>1</sup>, Mehmet Çimentepe<sup>1</sup>, Buket Şeflek<sup>1</sup>,  
Mehmet Ali Vardar<sup>2</sup>, Derya Gümürdülü<sup>3</sup>, Fügen Yarkın<sup>1</sup>

### ÖZET

Human papillomavirus (HPV) servikal kanserin primer sebebidir ve vakaların yaklaşık %100'ünde bulunur. Bu çalışmanın amacı Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Jinekoloji bölümüne başvuran kadınlarda yüksek risk HPV genotiplerinin pyrosequencing metodu ile tespitidir. Servikal sitoloji örnekleri 20-65 yaş arasındaki 1145 kadından toplanmıştır. HPV genotiplenmesi için pyrosequencing metoduna dayanan HPV Sign PQ genotipleme testi (Diatech Pharmacogenetics, Italy) kullanılmıştır. Pyrosequencing PyroMark Q24 cihazında (Qiagen) yapılmıştır. HPV enfeksiyonunun prevalansı toplam 1145 kadında %20 (229) idi. Tek HPV enfeksiyonu ve çoklu HPV enfeksiyonu sırasıyla, çalışma grubunun %11.8'inde (136) ve %8.2'inde (93) bulunmuştur. En baskın HPV genotipi HPV 16 (%9.4) olup bunu HPV 18 (%4.8) HPV 56 (%4), HPV 51 (%2.5), HPV 33 (%2.2), HPV 39 (%1.9), HPV 31 (%1.7), HPV 35 (%1.7), HPV 58 (%1.1), HPV 59 (%0.9), HPV 68 (%0.5), HPV 45 (%0.4), HPV 66 (%0.4) ve HPV 52 (%0.2) izlemiştir. Sonuç olarak, bölgemizde hastane bazlı yaptığımız bu çalışma 1145 kişinin katıldığı şimdiye kadar yapılan en kapsamlı çalışma olup en yaygın HPV tipleri olarak bulunan HPV 16 ve HPV 18 profilaktik HPV aşılarının hedefidir. Yeni jenerasyon dizi analizi metodu olan pyrosequencing test ile HPV genotiplerinin tanısı servikal kanser için risk altındaki kadınların tespitine katkı sağlayacaktır

**Anahtar Kelimeler:** HPV, genotip, pyrosequencing, servikal kanser, tarama

### ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is the primary cause of cervical cancer and is identified in approximately 100% of cases. The aim of this study was to detect HPV genotypes by pyrosequencing method among women attending the Department of Gynecology, Faculty of Medicine, University. Cervical cytology samples were collected from 1145 women aged 20-65 years old. HPV Sign PQ genotyping test (Diatech Pharmacogenetics, Italy) based on pyrosequencing method was used for HPV genotyping. Pyrosequencing was performed on PyroMark Q24 instrument (Qiagen). The prevalence of HPV infection was 20% (229) in total 1145 women. Single HPV infection and multiple HPV infection was found in 11.8% (136) and 8.2% (93) of the study population, respectively. HPV 16 was the most prevalent HPV genotype (9.4%), followed by HPV 18 (4.8%), HPV 56 (4%), HPV 51 (2.5%), HPV 33 (2.2%), HPV 39 (1.9%), HPV 31 (1.7%), HPV 35 (1.7%), HPV 58 (1.1%), HPV 59 (0.9%), HPV 68 (0.5%), HPV 45 (0.4%), HPV 66 (0.4%) and HPV 52 (0.2%). In conclusions, this study we conducted in our region based on hospitals is the most comprehensive study ever made up to 1145 participants HPV 16 and HPV 18 found as the most common HPV types are targeted by prophylactic HPV vaccines.

**Key Words:** HPV, genotip, pyrosequencing, servikal kanser, tarama.

Geliş Tarihi: 16/11/2017

Kabul Tarihi: 06/12/2017

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye0

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

<sup>3</sup>Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

**İletişim:** Fügen Yarkın

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

**Tel:** 0532 684 99 60

**E-posta:** fugeny@yahoo.com

## Giriş

Human papillomavirus (HPV) servikal kanser vakalarının yaklaşık %100'ünde bulunur ve servikal kanserin primer sebebi olarak kabul edilir. Dünyada her yıl 500.000 yeni servikal kanser vakası tanımlanmakta ve buna bağlı olarak 270.000 ölüm bildirilmektedir. Servikal kanser vakalarının %75-80'i kanser tarama programlarının yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (1,2).

HPV papillomaviridae ailesine ait, 5-50 nm çapında, zarfsız ikozahedral kapsidi olan, genomu sirküler çift sarmallı bir DNA virusudur. HPV'nin bugüne kadar 100'den fazla genotipi tanımlanmıştır. HPV genotipleri prekanseröz lezyon ve servikal kanserle ilişkilerine göre yüksek risk (HR; high risk) ve düşük risk (LR; low risk) olmak üzere ikiye ayrılır. Cinsel yolla bulaşan HPV tiplerinden karsinojen 14'ü yüksek riskli olarak nitelendirilmiştir. En önemli etken HPV tip 16 olup, bunu HPV tip 18, 45 ve 31 izlemektedir (3,4).

Cinsel olarak aktif kişilerin hayatlarında HPV ile enfekte olma olasılığı en az %50'dir ve kadınlarda HPV enfeksiyon prevalansı %2-44 olarak bildirilmiştir. Servikal HPV enfeksiyonları yaygın olarak görülmesine rağmen servikal kanser, HPV enfeksiyonunun oldukça geç ve nadir bir sonucudur. Genç kadınlardaki HPV enfeksiyonlarının çoğu, %70-90'ı geçicidir, genellikle klinik belirti görülmeden 6-12 ay içinde spontan olarak iyileşir. Vakaların az bir oranında, %10'dan azında ise persistent (kalıcı) HPV enfeksiyonu gelişir. Servikal kanser gelişmesi için persistent HR HPV enfeksiyonu gerekli, fakat tek başına yetersiz bir sebeptir. Persistent HR HPV enfeksiyonu olan kişilerde sigara, cinsel aktivitenin erken yaşta başlaması, uzun süreli oral konraseptif kullanımı, immun yetmezlik, multiparite, çok sayıda cinsel partner olması ve diğer cinsel yolla geçen enfeksiyonların varlığı, genetik predispozisyon gibi uygun kofaktörler varsa prekanseröz lezyonların ileri formları gelişir ve ortalama 15 yıl sonra servikal kansere ilerler. HPV enfeksiyonundan sonra servikal kanserin uzun sürede gelişmesi servikal kanser taramasının yapılmasına izin verir. Servikal kanseri önlemenin başlıca yolu düzenli servikal kanser taramasının yapılmasıdır. Böylece genellikle asemptomatik olan servikal prekanseröz lezyonların sitolojik tarama testi olan Pap testi ve HPV DNA testi ile erken tanısı ve anormal servikal sitoloji bulguları olan kadınlarda kolposkopi ve biyopsi sonucuna göre bulunan lezyonların tedavisi ile servikal kanser büyük oranda (>%90) önlenilebilir bir hastalıktır. Ayrıca günümüzde HPV DNA testinin servikal kanser taramasında ilk tarama testi olarak kullanımı ile ilgili algoritma çalışmaları sürmektedir (5,6).

Son 10 yılda HPV virusuna karşı konağın immun cevabı hakkında kazanılan bilgiler servikal kanserden

korunmak için profilaktik HPV aşılarının gelişmesini sağlamıştır. Yaygın kullanımda olan iki tip profilaktik HPV aşısı vardır. Her ikisi de HPV L1 virus benzeri partiküllerden oluşur. Aşılarından bivalent olanı HPV 16 ve HPV 18, kuadriyal olan dördümlü aşı ise HPV 16, HPV 18, HPV 6 ve HPV 11 enfeksiyonlarını önler. Ayrıca 2014 yılı sonunda lisans alan yeni bir 9 valanlı HPV aşısı geliştirilmiş olup HPV 6, 11, 16 ve 18'in yanı sıra 5 HPV tipini (HPV 31, 33, 45, 52 ve 58) hedeflemektedir ve böylece servikal kansere karşı aşının koruyuculuk oranı %70'den %90'a yükselmiştir (7).

Bu çalışmanın amacı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Jinekoloji Bölümüne başvuran kadınlarda HPV genotiplerinin dağılımını pyrosequencing metodu ile tespit etmektir.

## Gereç Ve Yöntem

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Hastalıkları polikliniğine başvuran, yaşları 20-65 yaş arası 1145 kadından özel fırça ile servikal hücre örneği alınıp fosfat tamponlu tuzlu su (Phosphate Buffered Saline; PBS) içerisine konuldu. Servikal hücre örnekleri 5000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Servikal sürüntü örneklerinde real-time PCR ve pyrosequencing metodu kullanılarak (HPV Genotipleme Testi, Diatech Pharmacogenetics, Italy) HPV yüksek risk tipleri araştırıldı.

Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan "Etik Kurul Onayı" alındı.

Servikal sürüntü örneklerinden viral DNA eldesi için yapılan ekstraksiyon EZ1 virus mini kit v2 (Qiagen, Germany) ile EZ1 Advanced (Qiagen) otomatize nükleik asit izolasyon cihazında yapıldı. DNA ekstraktları real-time PCR işleminde kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

HPV Genotipleme Testi (Diaterch Pharmacogenetics, Italy), HPV real-time PCR test ve pyrosequencing olmak üzere 2 aşamadan oluşmaktadır. HPV real-time PCR testi, HPV pozitif örneklerin tespiti için kullanıldı. Daha sonra HPV tiplerinin tespiti (16 yüksek riskli HPV, 7 orta riskli HPV ve 11 düşük riskli HPV) için PCR testinde pozitif bulunan ürünlerin spesifik sekans primerleri kullanılarak pyrosequencing metodu ile dizi analizi yapıldı. Çalışmamıza servikal kanser taramasında önemi olan sadece yüksek risk HPV tiplerinin sonuçları dahil edilmiştir.

HPV Real-Time PCR testi için Rotor-Gene Q 5plex real-time-PCR (Qiagen) cihazı kullanıldı. Her bir hasta örneği pozitif ve negatif kontroller için içinde EvaGreen Dye bulunan 25µL PCR master mix HRM (High resolution master mix, Qiagen), 13 µL saf su ve 2 µL HPV/β-Globulin primer solüsyonundan oluşan toplam 40 µL karışım hazırlanarak steril 0.2 mL'lik PCR tüp-

lerine eklendi. PCR mix üzerine sırasıyla hastalara ait DNA ekstraktlarından 10 µL, negatif kontrolden 10 µL ve pozitif kontrollerden (sırasıyla HPV 31, 16 ve 39 için HPV 1/2, HPV 3 ve HPV 4 nolu pozitif kontroller) 10 µL eklendi. Toplam 50 µL PCR reaksiyon karışımı içeren PCR tüpleri Rotor-Gene Q 5plex cihazının karusel (Carousel) aparatına yerleştirildi ve cihaz 95°C'de 3 dakika ve 50 siklus olmak üzere 95°C'de 30 saniye, 44°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye olmak üzere ısı döngüsü programında çalıştırıldı. Ardından ısı 72°C'den 1°C artırılarak 95°C'ye kadar yükseltildi ve pre-melting için 90 saniye bekletildi ve örnekler 5 saniye FAM (yeşil) kanalında bekletildi. Test başladıktan yaklaşık 3 saat sonra sonuçlar değerlendirildi.

HPV pozitifliği için cut-off değeri 1,6 olup β-Globulin geni için 0,5'tir. HPV PCR test sonuçları FAM kanalında (yeşil) gözlendi ve eşik değerinin üstündeki değerler pozitif kabul edildi. Daha sonra HPV genotiplerinin tespiti için PCR testine ait pozitif bulunan ürünlerin spesifik primerler kullanılarak pyrosequencing metodu ile dizi analizi yapıldı.

Pyrosequencing testi için PCR reaksiyonundaki forward primerler biyotinli olup sentezlenen biyotinli amplifikasyon ürünleri, streptavidin ile kaplı sefaroz boncuklara bağlanarak tek sarmallı DNA'ya ayrıştırıldı ve HPV genotiplerine yönelik 4 farklı sekans primerleri ile pyrosequencing analizi yapıldı. DNA polimeraz, ATP-sülfürilaz, lusiferaz ve apiraz enzimlerinden oluşan enzim karışımı (Enzyme mixture), adenozin 5' fosfosülfat ve lusiferinden oluşan substrat karışımı (Substrat mixture) ve dNTP'ler kartustaki (Pyromark Q24, Cartridge), protokole göre belirlenen kuyucuklara 120 µL enzim ve 120 µL substrat ve herbiri 96 µL olmak üzere dATPaS, dTTP, dCTP ve dGTP eklenerek Pyromark Q24 (Qiagen) cihazında pyrosequencing metodu ile dizi analizi gerçekleştirildi. Yaklaşık 66 dakika sonra sonuçlar elde edildi.

## Bulgular

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Jinekoloji Bölümüne başvuran ve servikal kanser tarama testi olan Pap testi yapılan kadınlarda onkojenik HPV genotiplerinin dağılımının tespiti için 1145 kadın çalışmaya dahil edil-

di. Hastaların yaşı 20-65 arasında olup 119'u (%10.4) 20-29 yaş arası, 381'i (%33.3) 30-39 yaş arası, 388'i (%33.9) 40-49 yaş arası, 194'ü (%16.9) 50-59 yaş arası, 63'ü (%5.5) 60-65 yaş arasında idi.

HPV genotipleme real-time PCR testi ile vakaların 916'sı (%80) HPV negatif ve 229'u (%20) HPV pozitif olarak tespit edildi. Toplam 1145 kadının HPV pozitif olan 27'si (%2.4) 20-29, 90'ı (%7.9) 30-39, 68'i (%5.9) 40-49, 36'sı (%3.1) 50-59 ve 8'i (%0.7) 60-65 yaş aralığında idi.

Kadınlarda tekli veya multiple enfeksiyon şeklinde 108'inde (%9.4) HPV tip 16, 55'inde (%4.8) HPV 18, 19'unda (%1.7) HPV 31, 25'inde (%2.2) HPV 33, 19'unda (%1.7) HPV 35, 22'sinde (%1.9) HPV 39, 5'inde (%0.4) HPV 45, 29'unda (%2.5) HPV 51, 2'sinde (%0.2) HPV 52, 46'sında (%4) HPV 56, 13'ünde (%1.1) HPV 58, 11'inde (%0.9) HPV 59, 5'inde (%0.4) HPV 66 ve 6'sında (%0.5) HPV 68 bulundu. (Şekil 1)

Çalışma grubundaki 1145 hastanın servikal sürüntü örnekleri sitolojik olarak incelendiğinde 1067'sinde (%93.2) normal sitoloji tespit edilmiş olup anormal sitoloji 78 örnekten (%6.8) 45'inin (%4) LSIL, 19'unun (%1.6) HSIL, 14'ünün (%1.2) ASCUS olduğu tespit edildi.

Normal sitolojisi bulunan 1067 kadının 180'inde (%16.8) HPV pozitif bulundu. Anormal sitolojisi olan 78 hastanın 49'unda ise (%62.8) HPV DNA bulundu. Bu gruptan LSIL tanısı alan 45 hastanın 27'si (%60), HSIL tanısı alan 19 hastanın 16'sı (%84.2), ASCUS pozitif olan 14 hastanın 6'sı (%42.8) HPV DNA pozitif tespit edildi. (Tablo 1)

HPV pozitif bulunan 229 vakanın servikal sürüntü örneklerinin sitoloji sonuçları incelendiğinde 180'inin (%78.6) normal, 27'sinin (%11.8) LSIL, 16'sının (%7) HSIL ve 6'sının (%2.6) ASCUS olduğu gözlendi.

HPV genotiplerinin prevalansı incelendiğinde HPV 16 normal sitoloji, LSIL, HSIL, ASCUS ve grubunda sırasıyla %0.8, %17.7, %47.3 ve %35.7 olarak tespit edildi. HPV 18 ise LSIL, HSIL, ASCUS ve normal sitolojide grubunda sırasıyla %8.8, %10.5, %0 ve %0.4 bulundu.

Tekli ve çoklu HPV enfeksiyonların sitolojik tanıya göre dağılımına bakıldığında LSIL grubundaki 45 kadının %35.6'sında (16) tekli, %24.4'ünde (11) ise çoklu

**Tablo 1** • Normal ve anormal sitolojisi olan kadınlarda HPV pozitifliği

|               | 20-29 yaş<br>sayı (%) | 30-39 yaş<br>sayı (%) | 40-49 yaş<br>sayı (%) | 50-59 yaş<br>sayı (%) | 60-65 yaş<br>sayı (%) | Toplam<br>sayı (%) |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Normal (1067) | 19 (1.7)              | 72 (7.2)              | 52 (4.8)              | 28 (2.6)              | 8 (0.7)               | 180 (16,8)         |
| LSIL (45)     | 6 (13.3)              | 7 (15.6)              | 9 (20)                | 5 (11.1)              | 0 (0)                 | 27 (60)            |
| HSIL (19)     | 1 (5.3)               | 8 (42.1)              | 5 (26.3)              | 2 (10.5)              | 0 (0)                 | 16 (84.2)          |
| ASCUS (14)    | 1 (7.1)               | 2 (14.3)              | 2 (14.3)              | 1 (7.1)               | 0 (0)                 | 6 (42.8)           |
| Toplam (1145) | 27 (2.4)              | 90 (7.9)              | 68 (5.9)              | 36 (3.1)              | 8 (0.7)               | 229 (20)           |

**Tablo 2** • Tekli ve çoklu HPV enfeksiyonların sitolojik tanıya göre dağılımı

| Sitolojik Tanı | Tekli Sayı (%) | İkili Sayı (%) | Üçlü Sayı (%) | Dörtlü Sayı (%) | TOPLAM Sayı (%) |
|----------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Normal (1067)  | 103 (9.6)      | 54 (5.1)       | 15 (1.4)      | 8 (0.7)         | 180 (16.8)      |
| LSIL (45)      | 16 (35.6)      | 6 (13.3)       | 5 (11.1)      | 0 (0)           | 27 (60)         |
| HSIL (19)      | 13 (68.4)      | 1 (5.3)        | 2 (10.5)      | 0 (0)           | 16 (84.2)       |
| ASCUS (14)     | 4 (28.5)       | 0 (0)          | 0 (0)         | 2 (14.3)        | 6 (42.8)        |
| Toplam (1145)  | 136 (11.8)     | 61 (5.3)       | 22 (2)        | 10 (0.9)        | 229 (20)        |

enfeksiyon ve HSIL grubunda 19 kadının %68.4'ünde (13) tekli, %15.8'sinde (3) ise çoklu enfeksiyon görüldü. ASCUS grubunda %28.5'inde (4) tekli, %14.3'ünde (2) çoklu HPV enfeksiyonu, normal sitolojili grupta ise %9.6'sında (103) tekli ve %7.2'sinde (77) çoklu enfeksiyon tespit edildi. HPV pozitif anormal ve normal sitolojili kadınlarda çoklu enfeksiyon tespit edilmiştir. HPV pozitif, normal ve anormal sitolojili kadınlarda çoklu enfeksiyon oranları ise normal sitolojili HPV pozitif 180 kadında %42.7 (77/180) LSIL sitolojili HPV pozitif 27 kadında %40.7 (11/27), HSIL sitolojisi olan HPV pozitif 16 kadında %18.7 (3/16) ve ASCUS pozitif ve HPV pozitif 6 kadında %33.3'tür (2/6). (Tablo 2)

Tek tip HPV enfeksiyonlarının %44.2'si HPV 16, %16.9'u HPV 18, %10.4'ü HPV 56, %8.1'i HPV 33 ve %20.4'ünde ise diğer tipler (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 66 ve 68) gözlemlendi.

İkili HPV enfeksiyon bulunan 61 hastanın %13'ünde HPV 16 ve HPV 18 koenfeksiyonu varken, %34.5'inde HPV 16 ve diğer tipler ve %21.3'ünde HPV 18 ve diğer HPV tipleri birlikte bulundu. Üçlü HPV enfeksiyonu bulunan 22 hastanın 7'sinde HPV 16 diğer HPV tipleri ile bulunurken 3'ünde HPV 18 ve diğer HPV tipleri birlikte bulundu. Ayrıca hastaların 3'ünde de HPV 16 ve HPV 18 diğer tiplerden sırasıyla HPV 66, 51 ve 58 ile birlikte bulundu. Kalan 9 kadında ise HPV 33, 35, 51 ve 56 gibi tipler tespit edildi. Dörtlü HPV enfeksiyonuna sahip 10 hastanın 9'unda HPV 16 ve diğer HPV tipleri bulunurken, 5'ine HPV 18 eşlik etmektedir. Bir hastada ise HPV 33 ve HPV 35 diğer tiplerle birlikte bulundu.

## Tartışma

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Jinekoloji bölümüne başvuran 1145 hastada HPV genotip prevalansını pyrosequencing testi ile araştığımız çalışmanın sonuçlarına göre HR HPV prevalansı %20 (229) olarak tespit edildi. HPV pozitif hastaların %7.9'u 30-39 ve %5.9 40-49 yaş gruplarında daha fazla görüldü.

Çalışma grubumuzda bulduğumuz %20 oranındaki HR HPV prevalansı, Yüce ve arkadaşlarının Ankara'da 2012 yılındaki %23 oranına benzer, Şahiner ve arkadaşlarının Ankara'da 2012 yılında bildirdiği %30.6 oranından düşük ve Tezcan ve arkadaşlarının Mersin'deki

%14.5, Fındık ve arkadaşlarının Konya'daki %14.4 bulgularından yüksektir (8-11).

Bölgemizde hastaneye başvuran 1145 kadında HPV genotiplerinin dağılımını incelediğimizde tekli ve multiple enfeksiyon şeklinde en yaygın görülen HPV tipi %9.4 oranla HPV 16 (108/1145) olup bunu HPV 18 %4.8, HPV 56 %4 ve HPV 51 %2.5 oranla izlemiştir. Ülkemizdeki çalışmalardan Konya'da Fındık ve arkadaşları %6.4 (16/250) ve Ankara'da Yüce ve arkadaşları da %11.9 (106/890) oranlarla HPV 16'yı baskın tip olarak tespit etmişlerdir (8-11). Ankara'da bulgularımızdan farklı olarak ikinci sırada HPV 31 ve HPV 51 %4.4 oranlarla bildirilmiştir. Oysa çalışmamızda ikinci yaygın HPV18 idi (8,11).

Çalışmamızda HPV DNA pozitif 229 hastanın %40.6'sında (93/229) multiple enfeksiyon bulunmuştur. Bu bulgumuz Şahiner ve arkadaşlarının 2014 yılında Ankara'da bildirdiği %42.7 oranına benzer, buna karşılık Konya'da Fındık ve arkadaşlarının %22.9, Şahiner ve arkadaşlarının Ankara'da 2012'de bildirdiği %28.7 oranlarından yüksektir (9,11,12).

Çalışmamızda normal ve anormal sitolojili kadınlarda HPV enfeksiyon oranlarına baktığımızda normal sitolojili kadınlarda %16.8 (180/1067) iken ASCUS grubunda %42.8 (6/14), LSIL grubunda %60 (27/45) ve HSIL grubunda ise %84.2 (16/19) oranlarla bulunmuştur. Böylece hücrelerde anomalite derecesi arttıkça HPV enfeksiyon oranlarının da giderek arttığı gözlenmiştir. Anormal sitolojili kadınlarda HPV enfeksiyon prevalansının %62.8 (49/78) tespit edilmiştir. Normal sitoloji grubunda bulduğumuz %16.8'lik HPV enfeksiyon oranını Mersin'deki %18.9, Ankara'daki Demir ve arkadaşlarının %17.9 ve yine Ankara'da Yüce ve arkadaşlarının %19.7 oranlarıyla benzerdir (8,10,13). Ancak Ankara'da Tüney ve arkadaşlarının normal sitolojili grupta bulunduğu %90.1'lik orandan düşüktür<sup>14</sup>. Yine Tezcan ve Tüney'in çalışmasında da en yüksek oranlar HSIL grubunda %75 ve %100 oranlarında tespit edilmiştir<sup>10,14</sup>. ASCUS ve LSIL grubundaki %42.8 ve %60'lık oranlarımız Tezcan ve arkadaşlarının sırasıyla %29.7 ve %42.9 oranlarından yüksek, buna karşılık Ankara'da Tüney ve arkadaşlarının bildirdiği %88 ve %100 oranlarından düşüktür (10,14).

Çalışmamızın sonuçlarını yurtdışında yapılan çalışmalarla kıyasladığımızda çalışma grubumuzda yüksek risk HPV prevalansı %20 olup Brazilyadaki %21.5 oranına benzer, İtalya, Bulgaristan ve Meksika'da sırasıyla %52.6, %61 ve %67.1 oranlarından oldukça düşük; İranda, Romanya'da ve Jamaika'da sırasıyla %31, %39.6 ve %34.6 oranlarından biraz düşüktür (15-21).

En baskın HPV tipi çalışmamızda %9.4 oranla HPV 16 olup, Brezilya'da Santos Filho ve arkadaşlarının çalışmasında %22.5, Bulgaristan'da Grozdanov ve arkadaşlarının çalışmasında %17.1, Meksika'da Salcedo ve arkadaşlarının çalışmasında %39.4 ve Romanya'da Moga ve arkadaşlarının çalışmasında %26 oranlarla yine en baskın tip HPV 16 olup oranlar bulgumuzdan yüksektir (15,17,18,20). Ancak yine HPV 16'nın baskın tip olarak bulunduğu İranda Yousefzadeh ve arkadaşlarının %7.3 ve Jamaika'da Lewis-Bell ve arkadaşlarının %6.2'lik oranlarından ise yüksektir (19,21). İtalya'da Meloni ve arkadaşları HPV tip 52'yi %23.4 oranla en baskın tip olarak bulurken HPV 53'ü %15.7 ve HPV 16'yı %15.4 oranla ikinci ve üçüncü sırada bulmuştur (16). Brezilya'da HPV 58 %14.4, Bulgaristan'da HPV 33 %3.9, Romanya'da HPV 31 %12.2 ve Jamaika'da HPV 33 %6 oranla ikinci sırada bulunmuştur (15,17,20,21). Çalışmamızda HPV 18 %4.8 oranla ikinci sırada olup benzer şekilde Meksika'da %7.5 ve İranda %2.8 oranla yine HPV 18 ikinci sırada tespit edilmiştir (18,19).

HPV ile enfekte 229 kişideki multiple enfeksiyon oranımız %40.6 olup, İtalya'daki Meloni ve arkadaşlarının %36.1 oranına benzer; Romanya'daki Moga ve arkadaşlarının %57'lik oranından düşük ve İranda %29.1 ve Bulgaristan'daki %24'lük oranlardan yüksektir (16,17,19,20).

Çalışmamızda HR HPV prevalansı normal sitolojili kadınlarda %16.8 (180/1067) olup, ASCUS grubunda %42.8 (6/14), LSIL grubunda %60 (27/45) ve HSIL grubunda ise %84.2'ye (16/19) yükselmiştir. Normal ve anormal sitolojili kadınlarda HPV genotiplerinin prevalansını incelediğimizde normal sitolojili kadınlarda HPV 56 %3.6 oranla en yaygın tip olup bunu HPV 39 %1.9, HPV 51 %1.7 ve HPV 31 %1.6 oranlarıyla izlemiştir. Prekanseroz lezyonlarda ve servikal kanserde baskın tip olarak gözlenen HPV 16 ise %0.8 oranında bulunmuştur. ASCUS grubunda HPV 16 %35.7 oranında olup bunu HPV 33 %14.3 ve HPV 51 %14.3 oranlar ile ikinci sırada ve HPV 35, HPV 56 ve HPV 58 her biri %7.1 oranlar ile izlemiştir. LSIL grubunda ilk sırada HPV 16 (%17.7) ve HPV 51 (%17.7) gözlenirken ikinci sırada HPV 33 (%13.3) ve HPV 56 (%13.3) ve üçüncü sırada HPV 18 (%8.8) ve HPV 58 (%8.8) bulunmuştur. HSIL grubunda ise yine HPV 16 en baskın tip olup %47.3 ile diğer gruplara oranla oldukça yüksek tespit edilmiştir. İkinci sıraya HPV 18 (%10.5) ve HPV 33 (%10.5) yerleşmiştir.

HPV pozitif normal ve anormal sitolojili kadınlarda multiple enfeksiyon oranları ise normal sitolojili HPV pozitif kadınlarda %42.7 (77/180), ASCUS pozitif ve HPV pozitif kadınlarda %33.3 (2/6), LSIL pozitif ve HPV pozitif kadınlarda %40.7 (11/27) ve HSIL pozitif ve HPV pozitif kadınlarda ise %18.7 (3/16) ile diğer gruptakilere göre daha düşük gözlemlendi. İspanya'da Lindemann ve arkadaşlarının çalışmasında normal sitolojili kadınlarda bulgularımızdan farklı olarak HPV 16 %17.8 ile birinci sırada bulunurken HPV 31 %12.8 ve HPV 52 %12.4 oranlarında izlemiştir. LSIL grubunda ise bulgumuza benzer şekilde HPV 16 %22.3 ile en baskın tip olup ikinci sırada HPV 53 %15.9 ve üçüncü sırada HPV 51 %14.1 oranlarında bulunmuştur. HSIL grubunda ise HPV 16 prevalansı %60'a yükselmiş olup HPV 31 %15.1 ve HPV 58 %12.2 oranlarında izlenmiştir (22).

Almanya'dan De jongs ve arkadaşlarının çalışmasında ASCUS, LSIL ve HSIL grubundaki HR HPV prevalansı %43.2, %78.9 ve %91.9 olup çalışma grubumuzdaki sırasıyla %42.8, %60 ve %84.2 oranları ile uyumludur. Normal sitolojili kadınlarda HR HPV prevalansı ise %26 olup aynı gruptaki bulgumuz %16.8'den yüksektir. Normal sitolojili kadınlarda HPV 51 (%6.8), HPV 16 (%4.9), ve HPV 42 (%4.9) en yaygın HPV tipleri olarak bildirilmiştir (23). Çalışmamızda ise normal sitolojili kadınlarda HPV 56 %3.6 oranla en baskın tip bulunmuş olup bunu HPV39, HPV 51 ve HPV 31 izlemiştir. Almanya'da ASCUS grubunda sırasıyla düşük riskli tip olan HPV 42'yi %9.9 ve yüksek riskli HPV 51'i ise %8.6 oranlarında ve LSIL grubunda yine düşük riskli HPV 42'yi %23.8 ve ardından HPV 16 ise %17.5 oranla ikinci sırada tespit edilmiştir. HSIL grubunda ise birinci sıraya HPV 16 %34.4 oranla yerleşmiş ve HPV 51 %19 oranla ikinci sırada bulunmuştur (23). Yine araştırmacıların multiple enfeksiyon oranları normal sitolojili kadınlar, ASCUS, LSIL ve HSIL grubunda sırasıyla %10.7, %16.7, %42.4 ve %46.2 olup bizim bulgularımızda sırasıyla ASCUS grubundaki %33.3'lük bulgudan düşük, LSIL grubundaki %40.7'ye benzer ve HSIL grubundaki %18.7'den yüksektir (23). Fransa'da Heard ve arkadaşları HR HPV oranlarını normal sitolojili kadınlarda %13.7, ASCUS grubunda %48.3, LSIL grubunda %68.9 ve HSIL grubunda %84.4 tespit etmiştir. Normal sitolojili kadınlarda bulgumuzdan farklı olarak HPV 16'yı %53 oranla en yaygın tip olarak tespit ederken ikinci sırada HPV 51 %2.8 oranda tespit edilmiştir ki biz HPV 51'i %1.7 oranıyla daha düşük oranda üçüncü sırada tespit ettik. Fransa'da ASCUS grubunda yine HPV 16 %14.7 oran ile bulgularımızla uyumlu olarak en yaygın tip olup, ancak %35.7'lik oranımızdan düşüktür. İkinci sırada ise HPV 53 %9.2 ve üçüncü sırada HPV 31 %8 oranında tespit edilmiştir. LSIL grubunda HPV 16 %20.9 ile birinci sırada bulunmakta olup bunu

HPV 53 %16.9 HPV 56 %16.2 ve HPV 51 %15.9 oranlarında izlemiştir. Oysa yüksek olması beklenen HPV 18 çok daha düşük %4.2 oranında bulunmuştur. HSIL grubunda ise sırasıyla HPV 16 %50.9, HPV 31 %12.2, HPV 51 %9.6 ve HPV 52 %7.6 oranlarıyla izlenmiştir. Fransadaki çalışmada da normal sitolojili kadınlarda %3'lük HPV 16 oranı prekanseröz lezyonların ciddiyetinin artmasıyla HSIL grubunda %50.9'a çıkmıştır (24). Meksika'da Aguiler-Lemarroy ve arkadaşlarının çalışmasında ise normal sitolojisi olan kadınlarda HPV prevalansı %12.4 ile bizim %16.8 oranımızla benzerdir. Normal sitolojili kadınlarda buldukları %63'lük multiple oranı ise bizim aynı gruptaki %42.7'den oldukça yüksektir (25).

Sonuç olarak bölgemizde hastane bazlı yaptığımız bu çalışma 1145 kişinin katıldığı şimdiki kadar yapılan en kapsamlı çalışma olup HPV enfeksiyon prevalansı ve HPV genotiplerinin dağılımı ile ilgili elde edilen moleküler epidemiyolojik bilgiler HPV DNA testinin kullanıldığı servikal kanser tarama programlarının oluşturulmasına ve günümüzdeki profilaktik HPV aşılarının etkinliğinin izlenmesine katkıda bulunacaktır.

## KAYNAKLAR

- Walhart T.J. Human Papillomavirus Biology, Pathogenesis, and Potential for Drug Discovery: A Literature Review for HIV Nurse Clinical Scientists. *Assoc Nurses AIDS Care*. 2015; 26(6):693-702.
- Comparetto C, Borruto F. Cervical cancer screening: A never-ending developing program. *World J Clin Cases*. 2015;3(7): 614-624.
- Fernandes JV, Fernandes TA. Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. *Human Papillomavirus and Related Diseases – From Bench to Bedside– A Clinical Perspective*. In Tech 2012 DOI: 10.5772/2464.
- Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015;7(7):3863-90.
- Bansal A, Singh MP, Rai B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *Int J Appl Basic Med Res*. 2016; 6(2):84-9.
- Lees BF, Erickson BK, Huh WK. Cervical cancer screening: evidence behind the guidelines. *Am J Obstet Gynecol*. 2016; 214(4):438-43.
- Moreira ED Jr, Block SL, Ferris D, et al. Safety Profile of the 9-Valent HPV Vaccine: A Combined Analysis of 7 Phase III. *Clinical Trials*. 2016;138(2)..
- Yuce K, Pinar A, Salman MC, ve ark. Detection and genotyping of cervical HPV with simultaneous cervical cytology in Turkish women: a hospital-based study. *Arch Gynecol Obstet*. 2012; 286(1):203-8.
- Sahiner F, Gümrall R, Sener K, ve ark. Investigation of HPV-DNA in cervical smear samples by two different methods: MY09/11 consensus PCR and type-specific real-time PCR. *Mikrobiyol Bul*. 2012; 46(4):624-36.
- Tezcan S, Ozgur D, Ulger M, ve ark. Human papillomavirus genotype distribution and E6/E7 oncogene expression in Turkish women with cervical cytological findings. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(9):3997-4003.
- Fındık D, Türk Dağı H, Arslan U, Fındık Y. Servikal örneklerde human papillomavirus sıklığı ve genotip dağılımını *Genel Tıp Derg* 2012; 22(4):116-20.
- Şahiner F, Kubar A, Gümrall R, ve ark. Efficiency of MY09/11 consensus PCR in the detection of multiple HPV infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014; 80(1):43-9.
- Demir ET, Ceyhan M, Simsek M, ve ark. The prevalence of different HPV types in Turkish women with a normal Pap smear. *J Med Virol*. 2012; 84(8):1242-7.
- Tüney İ, Altay A, Ergünay K, ve ark. HPV types and E6/E7 mRNA expression in cervical samples from Turkish women with abnormal cytology in Ankara, Turkey. *Turk J Med Sci*. 2017; 47: 194-200.
- Santos Filho MV, Gurgel AP, Lobo CD, Freitas AC, Silva-Neto JC, Silva LA. Prevalence of human papillomavirus (HPV), distribution of HPV types, and risk factors for infection in HPV-positive women. *Genet Mol Res*. 2016; 14;15(2).
- Meloni A, Pilia R, Campagna M, et al. Prevalence and molecular epidemiology of human papillomavirus infection in Italian women with cervical cytological abnormalities. *J Public Health Res*. 2014 ;3(1):157.
- Grozdanov P, Zlatkov V, Ganchev G, Karagiosov I, Toncheva D, Galabov AS. HPV prevalence and type distribution in women with normal or abnormal Pap smear in Bulgaria. *J Med Virol*. 2014; 86(11):1905-10.
- Salcedo M, Pina-Sanchez P, Vallejo-Ruiz V, et al. Human papillomavirus genotypes among females in Mexico a study from the Mexican institute for social security. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(23):10061-6.
- Yousefzadeh A, Mostafavizadeh SM, Jarollahi A, et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among women attending regular gynecological visit in Tehran. *Iran. Clin Lab*. 2014; 60(2):267-73.
- Moga MA, Irimie M, Oanta A, Pascu A, Burtea V. Type-specific prevalence of human papillomavirus by cervical cytology among women in Brasov, Romania. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(16):6887-92
- Lewis-Bell K, Luciani S, Unger ER, et al. Genital human papillomaviruses among women of reproductive age in Jamaica. *Rev Panam Salud Publica*. 2013; 33(3):159-65.
- Lindemann ML, Sánchez Calvo JM, Chacón de Antonio J, et al. Prevalence and Distribution of High-Risk Genotypes of HPV in Women with Severe Cervical Lesions in Madrid, Spain: Importance of Detecting Genotype 16 and Other High-Risk Genotypes. *Adv Prev Med*. 2011;
- De Jonge M, Busecke G, Heinecke A, Bettendorf O. Human papillomavirus genotype distribution in cytologically screened women from northwest Germany. *Acta Cytol*. 2013; 57(6):591-8.
- Heard I, Tondeur L, Arowas L, Falguières M, Demazoin MC, Favre M. Human papillomavirus types distribution in organised cervical cancer screening in France. *PLoS One*. 2013 14;8(11).
- Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Cortés-Gutiérrez EI, et al. Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: type-specific prevalence and HPV coinfections. *J Med Virol*. 2015; 87(5):871-84.