

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Bülent BAYSAL

**SERVİKAL SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE PCR YÖNTEMİYLE HUMAN
PAPİLLOMAVİRUS VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE TİPLENDİRİLMESİ**

Arş. Gör. Dr. Latife SÜTCÜ KIZILKAYA

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Bülent BAYSAL

KONYA

2011

TABLO DİZİNİ.....	ii
ŞEKİL ve RESİM DİZİNİ	iii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma.....	4
2.3. Yapı.....	7
2.4. Epidemiyoloji ve Bulaş.....	8
2.5. Patogenez.....	11
2.6. İmmünite.....	13
2.7. Klinik Belirtileri.....	13
2.8. Tanı.....	17
2.9. Tedavi	19
2.10. Aşı	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
4. BULGULAR.....	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
6. ÖZET.....	46
7. ABSTRACT.....	47
8. TEŞEKKÜR.....	48
9. KAYNAKLAR.....	49

TABLO DİZİNİ

Tablo I: HPV tiplerinin onkojenik risk gruplarına göre dağılımı

Tablo II: Bethesda sistemi

Tablo III: HPV tiplerinin dağılımı

Tablo IV: Birden fazla HPV tipiyle infekte hastalar

Tablo V: Smear sonuçlarına göre HPV DNA pozitifliği

Tablo VI: Yaş gruplarına göre HPV DNA pozitifliği

Tablo VII: Hastaların medeni durumlarına göre HPV DNA pozitifliği

Tablo VIII: İlk cinsel ilişki yaşına göre HPV DNA pozitifliği

Tablo IX: Partner sayısına göre HPV DNA pozitifliği

Tablo X: Doğum sayısına göre HPV DNA pozitifliği

Tablo XI: Sigara kullanımına göre HPV DNA pozitifliği

Tablo XII: Kondom kullanımına göre HPV DNA pozitifliği

Tablo XIII: Oral kontraseptif kullanımına göre HPV DNA pozitifliği

Tablo XIV: Yıl ve bölgelere göre HPV prevalansı

Tablo XV: HPV enfeksiyonu ve ilişkili risk faktörleri

ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ

Şekil I: HPV'nin filogenetik ağacı

Şekil II: LIPA stripi

Resim I: HPV pozitif ve negatif örnek sonucu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Servikal kanser kadın sağlığı açısından önemli konular arasında yer almaktadır. Serviks kanseri dünyada kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci en sık görülen kanserdir. Dünyada her yıl 470.000'den fazla yeni servikal kanser vakası tanınmakta ve servikal kansere bağlı yaklaşık 274.000 ölüm bildirilmektedir.

Tarama programlarının geliştirilmesinden önce serviks kanseri genellikle semptomatik olduğu ve nispeten ileri bir evrede yakalandığı için tedavi sonuçları kısıtlı kalmaktaydı. Ancak günümüzde serviks kanserinin preinvaziv değişikliklerinin erken tanısı ve tedavisi için planlanan tarama programlarının yaygınlaşması; invaziv serviks kanserinin insidansında ve buna bağlı ölümlerde belirgin bir azalmaya sebep olmuştur. Bu başarıda en etkin rolü sitoloji oynamıştır. Serviks kanseri tarama programının ilk basamağında kullanılan sitolojik bulgular, Bethesda terminoloji sistemine göre yorumlanmakta ve sitolojik sonuçların sınıfına göre izlemde takip edilecek basamaklar belirlenmektedir. Doğru sitolojik tanı, servikal preinvaziv hastalıkların yönetiminde en önemli aşama olmaktadır. Fakat değişik çalışmalarda, sitolojik tanı ile ilgili patoloğlar arasında uyumsuzluk bulunduğu gözlenmiştir. Dolayısı ile serviks kanseri tarama programlarında, alternatif tanı yöntemlerine gerek duyulmuştur. Son yıllarda Human Papillomavirus (HPV) testleri de yeni tarama teknikleri içerisine girmiş ve sitolojiyle birlikte kullanılmıştır.

Papillomaviridae ailesi içinde yaklaşık 40 tanesi genital mukozayı infekte edebilen 140'tan fazla virüs tipi bulunmaktadır. Papillomaviruslar küçük zarfsız ikosahedral simetrik, replikasyonlarını skuamöz epitelyal hücrelerde gerçekleştiren DNA viruslarıdır. Deri, larinks ve anogenital dokular dâhil olmak üzere tüm vücuttaki çeşitli epitelyal dokuları infekte ederler. Kutanoz HPV enfeksiyonu immün sistemi normal ve baskılanmış kişileri etkileyerek benign veya malign lezyonlara neden olabilir.

HPV enfeksiyonlarının klinik belirtileri geniş bir spektruma sahiptir; enfeksiyonlar bazen asemptomik ve benign seyrederken, zaman zaman da tekrarlayıcı ve tedaviye direnç gösteren, sürekli proliferasyon ile giden bir tablo ile karşımıza çıkmaktadır. Değişken klinik tablo virüsün tipine, lezyonun lokalizasyonuna, bireyin immünolojik durumuna ve epitelin doğasına bağlıdır.

HPV toplumda oldukça sık görülen ve cinsel yolla bulaşan bir infeksiyon ajanıdır. Genital HPV infeksiyonları, özellikle HPV genotip 16 ve 18'in sebep olduğu infeksiyonlar servikal kanser patogeneğinde en önemli risk faktörüdür.

Günümüzde, genital Human Papillomavirus tiplerinin, servikal kanserler ve prekürsör lezyonları ile olan ilişkisi bilinmektedir. HPV ile infekte olmuş hastaların tespit edilmesi, servikal kanser ilişkili HPV tipleri ile infekte hastaların belirlenmesi, gerekli tedavilerinin yapılması, muhtemel servikal kanser vakalarının engellenmesi açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmada amaç, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi ve Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi Kadın Doğum kliniklerine başvuran hastalardan rutin jinekolojik muayene sırasında alınan servikal sürüntü örneklerinde HPV pozitifliğini ve tiplerini belirlemek ve HPV DNA ve HPV tipleriyle smear patolojilerinin ilişkisini irdelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Human Papillomavirusların etken olduğu siğiller Antik Yunan ve Roma Çağlarından beri insanoğlu için bir problem olarak bilinmekteydi. Papillomavirus ile ilgili bilgiler geçmişte ve günümüzde sayısız bilim adamının katkısıyla elde edilmiştir. Papillomavirus tarihi iki kısımda incelenebilir:

1. Geçen yüzyılın başlarında yapılan hayvan deneyleriyle temel virolojik bilgiler elde edilmesi

2. 1970’li yıllarda insanlarda önemli bir hastalık etkeni olduğunun fark edilmesi

“Kondyloma” terimi Eski Yunanlılarda anüs çevresindeki kabarıklıkları ifade etmek için kullanılmıştır. 19. yüzyılın sonlarında genital siğiller kondyloma aküminatam olarak adlandırılmıştır.

1842’de İtalyan doktor Rigoni Stern 1760-1839 tarihleri arasında kanserden ölen vakaları incelemiş ve uterus kanserinin bakire ve rahibelerde daha nadir; evli ve dul kadınlarda daha sık olduğunu görmüş ve genital kanserlerin cinsel ilişkiyle ilgili olduğunu bildirmiştir. 1891’de Payne, 1896’da Jadassohn kutanöz siğillerin enfeksiyöz kaynaklı olduğunu bildirmiştir (1).

1907’de, Cuiffo tarafından yürütülen araştırmalarda insan siğillerinden elde edilen hücresiz ekstraktlar ile inokülasyon deneyleri yapılmış ve inokülasyon yapılan bölgede kutanöz siğillerin oluştuğu gözlemlenmiştir (1,2,3).

Shope ve Hurst tarafından 1933’de yapılan çalışmada, papillomavirus ilk kez tavşanlardan izole edilmiştir (1). Pamuk kuyruk tavşanındaki kutanöz papillomlardan elde edilen filtre edilmiş özütlerin malign potansiyelinin olduğunu gösterilmiştir. Günümüzde CRPV (Cottontail Rabbit Papillomavirus) olarak bilinen Shope papillomavirus viral tümörögenезin önemli bir modeli olmuştur (4). Bu çalışma, ilk memeli tümör virüsü deneyidir (5).

1950 ve 1960’larda papillomavirüslere olan ilgi azalmıştır. Bu dönemlerde geliştirilen doku kültür teknikleri papillomavirusların araştırılmasında çok faydalı olmamıştır. Çünkü bu virüsler doku kültüründe çalışmak için uygun değildi. Papillomavirusların viral kapsit ve genomik yapısının polyoma virüs ve SV40 (simian vaculoating virus) virüsü ile benzer olduğu görülmüş ve Papovaviridae ailesine dahil edilmiştir (4,5). 1960’lı yılların sonlarında elektron mikroskopuyla genital siğillerde viral partiküller gösterilmiştir (1).

1970'lerde moleküler klonlama tekniklerinin kullanıma girmesine kadar papillomavirüslerle yapılan çalışmalar yavaş ilerlemiştir (5). HPV ile serviks kanseri arasındaki ilişki ise ilk kez 1977 yılında zur Hausen tarafından bildirilmiştir (1). 1978'de Orth ve ark. EV (Epidermodysplasia Verruciformis) lezyonlarında iki yeni HPV tipini tanımlamışlardır. Sonraki iki yıl içinde ise HPV ile laringeal ve özofageal skuamöz hücreli kanserleri arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (1, 4, 6).

1980'li yıllarda moleküler yöntemlerin yaygınlaşmasıyla birlikte HPV ile ilgili dramatik gelişmeler kaydedilmiştir (1). HPV ile birçok klinik tablo arasında ilişki kurulmuş ve HPV enfeksiyonunun bütün dünya üzerinde toplumda yaygın olarak bulunduğu saptanmıştır (5). 1983'te Dürst ve ark. tarafından servikal kanserden yeni bir HPV tipi; HPV 16 izole edilmiştir (1,2). 1984'te Boshart servikal kanserden HPV 18'i izole etmiştir (2,4). 1989'da Barbosa ve ark. kanser hücrelerinde görülen HPV tiplerinde E6 ve E7 genlerini bulmuştur (6).

1991'de zur Hausen tarafından spesifik HPV tipleriyle anogenital kanser arasındaki ilişki bildirilmiştir (6). Bu yıllarda aynı zamanda Kirnbaurer ve ark. aşı çalışmalarında önem taşıyan VLP (virus-like particles)'yi invitro elde etmenin tekniklerini geliştirmiştir (1).

Günümüze kadar yayınlanan birçok epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmalarından elde edilen bilgiler, serviks kanseri ve öncü lezyonlarının gelişiminde HPV enfeksiyonunun en önemli basamaklardan biri olduğunu ortaya koymuştur.

2.2. Sınıflandırma

1950-1960'lı yıllarda, Papillomaviruslar (PV) ve Polyomavirusların yapılan temel nükleik asit analizleri ve elektron mikroskopisi incelemeleriyle, bu iki grubun çift iplikli sirküler DNA genomuna sahip ve ikosahedral simetrik zarfsız partiküller olduğu gözlemlenmiştir ve çok benzer oldukları düşünülerek bu viruslar tek bir aile içerisine dahil edilmişlerdir. Bu aileye ilk iki harflerinin birleşiminden oluşan Papovaviridae ailesi (papillomaviruslar, polyomaviruslar ve simian vacuolating viruslar) adı verilmiştir (5, 7).

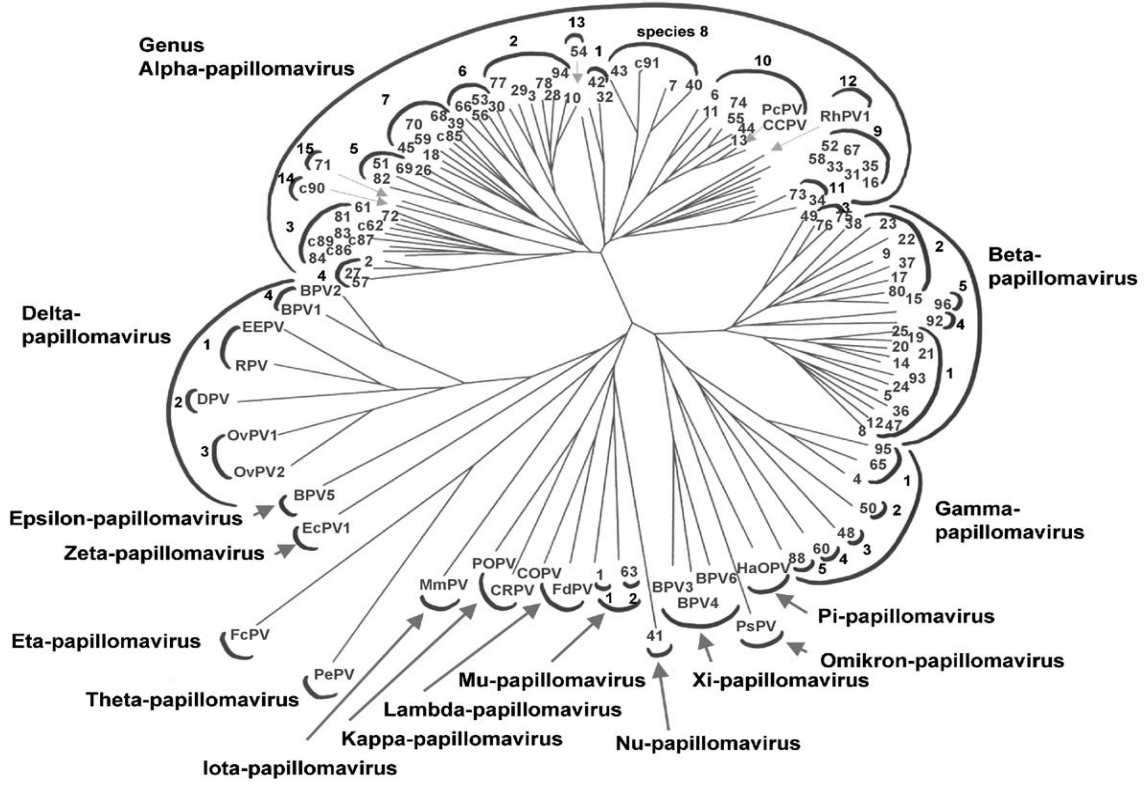
1980'lerde Danos ve ark. tarafından yapılan çalışmalar, bu ilişkinin çok yüzeysel olduğunu göstermiştir. Tüm polyomavirusların genom büyüklükleri 5 kb (kilobyte) civarında iken, Papillomavirusların 8 kb civarındadır. Papillomaviruslarda transkripsiyon sadece bir yönde meydana gelirken, polyomaviruslar iki transkripsiyon alt birimi içerirler. En önemlisi Polyomaviruslar ve Papillomaviruslar; T-antijenleri ve E1 genindeki çok küçük homolog bir segment dışında herhangi önemli bir nükleotid

veya aminoasit dizi benzerliği içermemektedir. Yapılan bu genomik incelemelerden sonra bu virusların farklı ailelerden olduğu sonucuna varılmıştır. Yakın bir süre önce bu aile International Council on Taxonomy of Viruses (ICTV) tarafından resmen papillomaviridae ailesi olarak tanımlanmaya başlamıştır (7).

Önceleri HPV sınıflandırılması farklı mukozal ve dermal bölgelere olan eğilimlerine göre yapılmakta iken, bugün DNA dizi homolojisi göz önüne alınarak orjin aldıkları türe ve aynı tür içindeki genetik ilişki derecesine göre yapılmaktadır.

L1 ORF (Open reading frame) genomdaki en iyi korunmuş gen bölgesidir ve bu yüzden 15 seneyi aşkın bir süredir yeni PV (Papillomavirus) tiplerinin tanımlanmasında bu bölge kullanılmaktadır. Bir papillomavirus izolatı aynı türdeki diğer papillomavirus tiplerinin DNA' sına %50' den daha az homoloji gösteriyorsa yeni bir **genotip** olarak kabul edilir. Yeni PV örneği tam genomu kopyalanmış ve bilinen PV tiplerinin L1 ORF' sinin DNA dizilerinden %10'dan daha fazla farklılık içeriyorsa yeni bir **tip**, farklılık %2–10 arasında ise **subtip** ,%2'den az ise **varyant** olarak isimlendirilir (8). Günümüzde yeni bulunan papillomavirus izolatlarının nükleotid dizileri, Papillomavirus Referans Merkezi (Heidelberg/Almanya) tarafından doğrulanmaktadır (9). HPV'nin L1 proteinindeki DNA sekans bölgeleri baz alınarak yapılan filogenetik sınıflandırma güncel olarak kullanılmakta olan sınıflandırma şeklidir (10). Filogenetik ağaç, 96 HPV tipi ve 22 hayvansal papillomavirus tipini içermektedir (9). HPV'nin filogenetik ağacı şekil I'de gösterilmiştir.

şu anda Yunan harfleri ile belirtilen 16 HPV genusu bulunmaktadır. Bunların beşi; alfa, beta, gama, mü ve nü HPV, diğer yedisi ise bir kısmı maymun, kuş ve çeşitli memelilerde görülen papillomaviruslardır (7).



Şekil I: HPV'nin filogenetik ağacı

Filogenetik ağaç 118 papillomavirus tipinin sekanslarını içermektedir. Her bir dalın sonundaki numaralar tanımlanmış HPV tipini göstermektedir. c-numara ise aday HPV tiplerinden söz etmektedir. “cand” (candidate=aday) terimi genomu klasik klonlama tekniklerinden ziyade PCR kullanılarak tanımlanan papillomavirus tipleri için kullanılır. Diğer kısaltmalar hayvan papillomaviruslarını göstermektedir. En dıştaki yarım dairesel sembol, izole edilmiş papillomavirus genusunu (örneğin; genus alfa-papillomavirus), içteki yarım dairesel sembollerdeki numaralar, papillomavirus türünden söz etmektedir.

Yukarıdaki şekilden örnek vermek gerekirse HPV tip 18, 39, 45, 59, 68, 70 ve c85 alfa-papillomavirus genusunda yer alan HPV tür 7 içinde yer almaktadırlar (7, 8).

Klinik açıdan en önemli genus alfa-papillomaviruslardır. Bu grubun içindeki bütün HPV tipleri genital ve mukozal lezyonlarla ilişkilidir. Servikal kanser ile ilişkili yüksek riskli HPV tipleri bu genustaki tür 5, 6, 7 ve 9 içinde yer alırlar. HPV tip 16 tür 9, HPV tip 18 tür 7 içinde yer alır. Beta-papillomaviruslar EV ile ilişkili HPV tiplerini içerir. Beta ve gama genusundaki bazı papillomaviruslar kommensaldir ve etkilerini gösterebilmeleri için başka bir virüse gerek duyabilirler. Delta genusunda BPV-1 (Bovine Papillomavirus) ve diğer hayvan papillomavirusları bulunur (11, 12).

2.3. Yapı

Human papillomavirus, 50-55 nm büyüklüğünde zarfsız bir virüstür. Çift iplikli çembersel DNA iki ayrı proteinden oluşan 72 kapsomerli ikosahedral kapsit ile çevrilidir. Elektron mikroskopik incelemede, bu kapsomerlerin 60'nın ikosahedral yapının eşkenar üçgen yüzlerinde ve 12'sinin köşelerde yer aldığı gösterilmiştir. Major kapsit proteini (55 kilodalton) ve minör kapsit proteini (70 kilodalton) sırasıyla viral genom üzerinde bulunan L1 ve L2 bölgelerinden sentez edilir. Majör kapsit proteini HPV cinsine özgü (bütün HPV tipleri için ortak) antijeniteye sahiptir. Viral genom 8000 baz çifti uzunluğundadır ve guanin/sitozin oranı hemen hemen bütün HPV tiplerinde %42'dir. Birçok papillomavirusun genomu klonlanmış ve yaklaşık 20'sinin tam nükleik asit dizisi çıkarılmıştır. Ayrıca viral DNA hücresel histonlarla birlikte kromatin benzeri yapılar oluşturmaktadır (5, 13).

HPV genomu 3 bölgeye ayrılmaktadır:

1. Erken bölge (early region, ER): Viral transkripsiyon regülasyonu ve onkojenlerle ilgili proteinleri kodlar.

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 ayırır. Virüsün regülatuar fonksiyonlarını yürüten bölgedir.

Erken bölge viral çoğalmada önemli rol oynar, geç bölgede ise kapsit proteinlerinin yapımından sorumlu iki ayrı genetik kod vardır (5). Erken bölgede 8 ayrı genetik kodlama bölgesi bulunur. Bu bölgelere ORF (open reading frame- açık okuma bölgeleri) denir, bu ORF'ler tek zincirli DNA'dan sentezlenen polsistronik mRNA'lar tarafından eksprese edilir (14). Farklı erken bölgelerinin farklı görevleri vardır:

E1: Viral DNA'nın replikasyonundan sorumludur. DNA'nın sirküler, normal durumda kalmasını sağlar (helikaz aktivitesi) ve ayrıca ATPaz aktivitesi (15) gösterir. E1 papillomaviruslar tarafından kodlanan tek enzimdir (16).

E2: Viral transkripsiyonunun aktivasyonu ve düzenlenmesini sağlar. E2 replikasyon bölgesinde E1'in fonksiyonlarını destekleyen ve ayrıca E6 ve E7 transkripsiyonunu düzenleyen bir DNA-binding proteindir (14).

E3: Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Çoğu HPV tipinde bulunmaz.

E4: Viral siklusun geç dönemlerinde rol oynar, virüsün olgunlaşmasını, virionların oluşturulmasını ve serbest kalmasını, infekte hücrenin sitokeratin matriksini parçalamasını sağlar (15).

E5: İşlevi tam olarak bilinmemektedir. E5 proteini endoplazmik retikulumda yerleşmiştir. Transformasyonla ilgisi olduğu düşünülmektedir, EGF/PDGF (Epidermal Growth Factor/ Platelet-derived Growth Factor) reseptörlerine bağlanır.

E6: E6 ORF 150 aa.ten oluşan bir onkoproteini kodlar. HR (High Risk) E6 proteini DNA tamiri ve apoptozisi düzenleyen tümör supresör geni olan p53'ün yıkımını artırır. E6 proteini ayrıca telomerazın aktivasyonuna neden olur.

E7: HPV'nin majör transforme edici onkojenidir. Fonksiyonunu pRB (retinoblastoma) tümör supresör proteinlerine bağlanarak yapar. E7'nin pRB'ye bağlanması transkripsiyon faktörlerinin salgılanmasına neden olur. Böylelikle hücre S fazına girerek replike olur.

E1^E4: Viral siklusun geç döneminde eksprese edilir. Aminotermal ucundaki ilk 5 aminoasitin E1 ORF, geri kalan kısmının E4 ORF tarafından sentezlenmesiyle oluşan bir füzyon proteindir. Yüksek riskli tiplerde hücrelerdeki sitokeratin ağını inhibe eder.

HPV infeksiyonlarının maligniteye ilerleme potansiyeli, büyük oranda HPV genomları tarafından kodlanan primer onkoproteinler E6 ve E7' nin biyokimyasal aktiviteleri ile sağlanmaktadır. E4 ve E5 gibi diğer onkoproteinlerin de katkıları ile yüksek riskli tiplerden salınan E6 ve E7 kromozomal bozulmaları indükler (3, 15, 16, 17, 18).

Geç bölgede L1 ve L2 denen iki büyük ORF bölge vardır.

L1: Majör kapsit proteinlerinin pentamerik kapsomerlerinin sentezinden sorumludur. HPV aşılarının hedef bölgesi olan VLP'ler L1 proteininden oluşmaktadır.

L2: Minör kapsit proteininin sentezinden sorumludur. HPV tipine özeldir.

Long control region; 400-700 baz çiftinden oluşan kodlama yapmayan viral DNA replikasyon orijinini bulduran bölgedir. Transkripsiyon faktörleri ve çeşitli enhancer ve repressör proteinler için bağlanma bölgesi bulunan kompleks bir düzenleyici bölgedir (16).

2.4. Epidemiyoloji ve Bulaş

HPV zarfı olmadığından nispeten stabil bir virüstür, pek çok ortamda aylarca kalabilir. Ayrıca virüs partikülü ısıya da dayanıklı olup genellikle fiziksel ve kimyasal ajanlarla inaktivasyona dirençlidir. Bu nedenle kontamine olmuş yüzeyler ve eşyalarla geçiş olasıdır. Human papillomavirus, kutanöz ve mukozal epitelyal hücrelere tropizm gösterir (15). Bazal hücrelerin infeksiyöz virüsle karşılaşmasının, seksüel temas ile veya epitelin deri abrazyonu gibi minör travmaya maruz kalması sonucu olduğu düşünülmektedir (10, 19). Lezyonun lokalizasyonu, infeksiyöz virüs partikül miktarı, travmanın şiddeti, HPV tipi ve bireyin bağışıklık durumu HPV geçişini etkileyen faktörlerdir. Hücresel immünitesi baskılanmış kişiler, HPV infeksiyonuna daha duyarlıdır. HPV infeksiyonu immunsupressif tedavi alan hastalarda normal popülasyona nazaran daha

sık (%43) görülmektedir. Çocuklarda ve genç erişkinlerde % 10'lara varan oranlarda plantar ve yaygın siğiller görülürken erişkinlerde daha az saptanması kazanılmış immüniteye bağlı olabilir (5).

Servikal karsinoma dışında HPV'nin bazı deri maligniteleri, baş ve boyunda; oral kavite, orofarinks ve larinks kanserleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır (20, 21, 22). 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 tip 6, 16 saptanabilmektedir (23). Ayrıca virüsün melanom dışı deri kanserlerinde de rolü olduğu bildirilmiştir (24).

Günümüzde sayıları 140'ı aşan HPV genotiplerinden yaklaşık 40 kadarı genital sistemi tutmakta olup, bunlardan en az 15' nin serviks kanserlerinin > %99'dan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Mukozaya afiniteleri olan HPV genotipleri benign ya da malign oluşumlarla ilişkilerine göre düşük-risk ve yüksek-risk olarak iki gruba ayrılmıştır (Tablo I). İnfekte kadınlarda servikal kanser riskini arttıran virüs tipleri yüksek riskli olarak adlandırılmaktadır. Yüksek riskli tipler olan HPV 16 ve HPV 18 servikal kanserin %70'inden sorumlu gözükmektedir. Söz konusu tablonun %50-60'ında tip 16, yaklaşık %10-20'sinde tip 18 etken olarak bulunmaktadır. Düşük riskli HPV tiplerinin ise nadiren kansere yol açtığı gözlenmiştir. Düşük riskli grup sıklıkla benign genital siğillerin oluşumuna sebep olur. HPV 6 ve 11 condyloma accuminata veya genital siğillerin %90'dan fazlasının sebebidir (10, 15, 18, 23, 25)

Tablo I: HPV tiplerinin onkojenik risk gruplarına göre dağılımı (26)

Onkojenik risk grubu	HPV tipleri
Düşük onkojenik riskli	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
Yüksek onkojenik riskli	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Muhtemel yüksek riskli	26, 53, 66

Amerika'da her yıl yüksek riskli HPV ile infekte 6.2 milyon yeni vaka olduğu tahmin edilmektedir. Genital organların HPV infeksiyonları halen en sık cinsel temasla bulaşan hastalıklar arasında yer almaktadır. Virus ile infekte asemptomatik kişiler virusun yayılmasında önemli rol oynamaktadır. İnfekte bireylerle cinsel temasta bulunan kişilerin üçte ikisi bu virüse maruz kalmaktadır. Bu nedenle tüm popülasyonda HPV infeksiyonları sık görülmektedir. Seksüel yönden aktif kişilerin % 50'sinden fazlasının hayatlarında en az bir kez bir ya da daha fazla HPV tipi ile infekte oldukları düşünülmektedir. İnfekte

bireylerin çoğunda klinik bir belirti olmadan virüs elimine edilmektedir. Dünyada HPV ile infekte kadınların prevalansı % 2-44 arasında değişmektedir. Prevalans değerlerindeki farklılığın sebebi çalışmaya alınan hasta popülasyonlarındaki yaş aralığının ve çalışılan moleküler yöntemlerin duyarlılıklarının farklılığından kaynaklanmaktadır. Özellikle cinsel aktivitenin artış gösterdiği 15-50 yaş arası bireylerde anogenital HPV enfeksiyonları sık görülmektedir (10, 27).

Amerika'da yapılan bir çalışmada yüksek riskli HPV prevalansı % 27.4 bulunmuştur. Yine Amerika ve Kanada'da kadın üniversite öğrencileri arasında yapılan bir çalışmada HPV prevalansı benzer bulunmuştur (28).

Genital HPV enfeksiyonu için en belirgin risk faktörleri, hayat boyu cinsel partner sayısı, ilk cinsel ilişki yaşı ve erkek partnerin seksüel davranışlarıdır (12, 29, 30). En yüksek prevalans 20-24 yaşlar arasındadır. Yapılan birçok çalışmada HPV prevalansında 25 yaşından sonra keskin bir düşüş olduğu belirtilmektedir (31). Kjaer ve ark. artan cinsel aktivite sayısına rağmen HPV prevalansının yaşla birlikte azaldığını gözlemlemiştir. Bu durumu kazanılan HPV enfeksiyonuna karşı gelişen immün yanıtın yeni enfeksiyon oluşumunu önlediğini düşünerek açıklamışlardır (27).

Farklı bölgelerde yapılan birkaç çalışmada ise HPV prevalansının 25 yaş altında pik yaptığını, 35-54 yaş arası düştüğünü, 55 yaştan sonra ikinci bir pik yaptığı görülmüştür. Bunun da menapoz ve immünitadaki değişikliklere bağlı olduğu düşünülmektedir. HPV enfeksiyonu erkekler arasında da oldukça yaygındır. Finlandiya'da 285 askerin (ort. yaş 19.8) genital örneklerinde yapılan PCR incelemeleri sonucu HPV prevalansı % 16.5 bulunmuştur. Amerika'daki 318 üniversite öğrencisi (ort. yaş 20.5) ile yapılan bir çalışmada ise prevalans % 32.7 bulunmuştur (23, 28).

Cinsel partner sayısı ile HPV enfeksiyonu arasında da güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Ayrıca erkek partnerinin yaşam boyu cinsel partner sayısının fazla olması da enfeksiyon riskini artırır (28).

Wang ve ark. yaptığı bir çalışmada sigara ile HPV arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bununla beraber Bauer ve ark. yaptığı bir çalışmada ise daha önce sigara içen kişilerdeki HPV prevalansının hiç sigara içmemiş kişilere oranla daha düşük olduğunu göstermiştir (28).

Seksüel aktivite HPV enfeksiyonu bulaşında primer risk faktörüdür. Diğer cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların birçoğunda bulaşmayı önlemede etkili olan kondomun HPV enfeksiyonlarına karşı kısmen koruyucu olduğu düşünülmektedir. Sürekli kondom kullanımında bile %60 koruma sağlamaktadır. Çünkü genital bölgedeki cilt teması ile bulaş

hala mümkündür (10, 12). Bununla beraber Hogewoning ve ark.'nın 2003'te yaptığı bir çalışmada servikal prekanseröz lezyonu olan kadınlarda kondom kullanımının lezyonların gerilemesine yol açtığı gösterilmiştir. Tanı aldıktan sonra kondom kullanan hastalarda 2 yılın sonunda lezyonlarında %53, kondom kullanmayan grupta ise %35 gerileme görülmüştür. Kondom kullanımının HPV infeksiyonlarını önlemedeki rolü ile ilgili net bir yargıya varılamamıştır (32).

2.5. Patogenez

Human papillomavirusun hayat siklusu epitel hücrelerinin farklılaşmasına son derece bağlıdır. Papillomaviruslar deri ve mukoz membranların skuamöz epitel hücrelerini enfekte ederek ve burada replike olarak epitelyal proliferasyona yol açarlar. Sınırlı ve intakt bazal membrana sahip olan bu lokalize hiperplaziye verruka veya papillom adı verilir. Papillomların genellikle infekte bir bazal hücrenin monoklonal çoğalması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Bir papillomun oluşumu virüsün inokülasyonundan sonra 6 hafta ile 2 yıl gibi bir zaman süresi içinde gerçekleşmektedir (5).

İnfeksiyonun başlangıç yeri, immatür skuamöz epitelin HPV için reseptörler bulunduran bazal hücreleridir. Human papillomavirus için epitel hücrelerinde spesifik reseptörler tam bilinmemekle beraber heparan sülfat ve integrin'in virüsün hücrelere bağlanmasında rol oynadığı belirlenmiştir (33, 34). Bazal epitelyal katmanının infeksiyonunun ardından HPV, hücrede ortalama 50 kopya olacak şekilde nükleusta epizom oluşturur. HPV epizomları konak hücre DNA'sı ile replike olur ve hücre bölünmesi sırasında infekte yavru hücreler bazal tabakadan suprabazal tabakaya göç eder ve burada farklılaşır. Suprabazal tabakaya ulaştığında, HPV ile infekte hücreler S fazına girerek hücre başına binlerce HPV DNA kopyası oluşturur. Normal deride bulunan bütün tabakaları içeren lezyonlarda bütün hücreler viral genomu içerir ancak, viral genlerin ekspresyonu hücrelerin diferansiyasyon durumuna bağlıdır. 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 bulaşıcıdır. Hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon ile birlikte anormal nükleus varlığı (koilositoz) papillomavirus infeksiyonlarının histopatolojik olarak karakteristik özelliğidir (17, 35, 36).

Viral infeksiyon genellikle lokal kalır veya spontan olarak kaybolur, nadiren immün sistemi baskılanmış hastalarda yayılabilir. Papillomavirüsler epitelin bazal tabakasında kalıp daha sonra tekrarlayan infeksiyonlara neden olabilirler.

Onkojenik yönleriyle oldukça geniş çapta incelenmiş olan HPV'ler özellikle mukozal papillomavirüsler başta olmak üzere hem benign hem de malign tümörlerde gösterilmiştir. Epidemiyolojik olarak HPV tip 16 ve 18'in servikal displazi ve kanserle yakın ilişkisinin saptanmasının yanı sıra invitro olarak hücre kültürlerinde transformasyon kapasiteleri gösterilmiştir. Papillomavirusların karsinojenik potansiyeli multifaktöryel sebeplerle açıklanmaya çalışılmaktadır. Hücresel bir transformasyonun meydana gelmesinde papillomaviruslar gerekli, ancak buna eşlik eden diğer faktörlerin olmadığı durumlarda yetersiz kalmaktadır.

İnsanlarda HPV ile kanser arasındaki ilişki ilk kez EV'li hastalarda gösterilmiştir. EV'li hastaların çoğunda hücresel immünitede bir bozukluk olması ile birlikte hastaların lezyonlarında malign dejenerasyon özellikle güneş (kokarsinojen) gören bölgelerdeki lezyonlarda meydana gelmektedir. Benzer şekilde larinks kanserlerinin radyasyon tedavisi sonrasında geliştiği nadiren respiratuar papillomatozise bağlı olduğu gösterilmiştir. HPV kapsit antijeni in situ ve invazif larinks kanserlerinde tespit edilmiştir (5, 35).

HPV'nin malignensilerdeki rolü en çok servikal kanserlerde araştırılmış ve ilişkileri in vivo ve invitro çalışmalarda saptanmıştır. Serviks skuamöz hücre karsinomlarının %99'dan fazlası skuamöz hücrelerin onkojenik papillomavirus tipleri ile infeksiyonuna bağlıdır. Çalışmalar HPV'nin serviks adenokarsinomu patogenezinde rolü olduğunu göstermiştir (17, 35).

Morfolojik olarak benign lezyonlarda HPV tiplerinin viral genomları epizomal durumda bulunmaktadır. Ancak, malign ve yüksek derecede intaepitelyal neoplazilerde konakçı hücresinin kromozomal DNA'sına entegre durumdadır. Konakçı DNA'sına entegre olduğu yer değişkendir ve özgül bir bölge mevcut değildir. Yüksek riskli HPV ile ilişkili lezyonlarda transkripsiyonel aktivite her zaman vardır (17).

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 parçalanmasıyla yüksek düzeylerde E6/E7 mRNA ekspresyonu gerçekleşir. E6 proteini p53'ün yıkılmasına ve telomerazın aktivasyonuna neden olur. Benzer ve sinerjistik olarak E7 proteini Rb proteinini degrade ederek transkripsiyon faktörü EF2'nin inhibisyonunu önler. Veriler HPV E5 geninin de hücre transforme edici kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmalar E5 transfekte hücrelerde transforme hücre fenotipinin göstergesi olan anchorage- bağımsız hücre

büyümesinin indüklendiğini göstermiştir. E5 transfekte hücreler farelerde tümör oluşturma yeteneğine sahipken, epidermal büyüme faktörü E5 geni ile yardımlaşarak koloni büyüklüğünü artırabilmektedir (17, 31, 35).

2.6. İmmünite

Human papillomavirus infeksiyonlarına karşı immün cevap geç oluşur. Human papillomavirus latent ve non-litik infeksiyon oluşturduğundan ve viremi fazı olmadığından HPV'ye karşı antikor oluşumu HPV DNA tespitinden 8- 18 ay kadar uzun bir süre sonra ve çok düşük düzeyde gelişir. Ayrıca HPV ile infekte keratinositlerin yüzeylerinde az miktarda HPV antijeni sunmaları da virusun immün cevaptan kaçmasına neden olur.

Human papillomavirusun major 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 16 DNA pozitif kadınların yaklaşık % 50'sinde IgG antikor cevabı oluşur ve yıllarca kalabilir.

HPV intrasellüler bir infeksiyon olduğundan ve viremi oluşturmadığından antikor yanıtı en tepe noktasında bile oldukça düşüktür. Antijen uyarımı düşük olduğundan B ve T hücrelerinin yüksek oranda aktive olması engellenir. Ancak düşük seropozitivite ile de koruyuculuk sağlanabilir (28, 33, 37).

Hücrel immünitinin suprese olduğu HIV hastalarında ve transplantasyon yapılan kişilerde HPV infeksiyonlarının daha sık görülmesi, Human papillomavirus lezyonlarının spontan regresyonunda hücrel immünitinin etkin olduğu fikrini desteklemektedir (5, 10, 38, 39).

Servikal HPV infeksiyonlarının çoğunda HLA- Klas 1 ekspresyonunun azaldığı görülürken HLA-Klas 2 ekspresyonunun artması dikkat çekicidir (33).

2.7. Klinik Belirtileri

Human papillomavirusun klinik belirtileri asemptomatik ve benign lezyonlardan tekrarlayıcı ve tedaviye dirençli proliferatif tablolara kadar giden geniş bir yelpaze ile karşımıza çıkmaktadır. Bu geniş değişken klinik tablo, virüsün tipine, lezyonun lokalizasyonuna, bireyin immünolojik durumuna ve epitelin türüne bağlanabilir (5).

2.7.1. Deri infeksiyonları

En sık çocuklarda ve gençlerde verrüköz lezyonlar tablosuyla ortaya çıkar.

2.7.1.1. Basit Sigiller (Verruca vulgaris)

Karakteristik olarak el ve parmaklarda tek veya multipl lezyonlar halinde meydana gelir ve daha çok HPV tip 1, 2, 3 ve 4 tarafından oluşturulur. Bazı sigiller kaybolur, fakat çoğu

kozmetik sebeplerden dolayı tedavi edilir. Buna karşılık önemli bir oranı tedavinin tipine bakmaksızın tekrarlar (40).

2.7.1.2. Verruca plantaris

Genellikle HPV tip 1- 4 ile oluşur. Sıklıkla ayak tabanında tek bir lezyon olarak ortaya çıkar. Deri yüzeyinden yukarıya yükselmezler. Fakat tabanın içine doğru ilerlediklerinden ağrılıdır. Tedaviye genelde iyi cevap verirler (40).

2.7.1.3. Verruca plana

Bu tip siğiller çocuk ve genç kızlar arasında deriden hafif yüksek olarak görülen ve plana juvenil diye de adlandırılan siğillerdir. En çok HPV tip 3, 10 ve 27 ile ilişkilidirler. Bu siğillerin yüzeyi düzgündür, papüler değildir. Çoğunlukla yüzde, elin sırtında, önkolda veya bacaklarda gruplar halinde görülür (40).

2.7.1.4. Epidermodysplasia verruciformis

Bu hastalık otozomal resesif geçiş gösteren nadir bir durumdur. Sellüler immünitinin azalması ve HPV enfeksiyonuna duyarlılıkta artış ile karakterizedir. Çocuklukta kazanılan ve ömür boyu devam eden enfeksiyon, deri üzerinde geniş biçimde yayılan çok sayıda siğillerle karakterizedir. Hastalarının yaklaşık 1/3'ünde, yıllar içinde, skuamoz hücreli karsinom ortaya çıkmaktadır (24, 40).

2.7.2. Mukozal enfeksiyonlar

Genital, respiratuvar, oral mukozalar ve konjunktiva HPV'nin infektif etkisine en duyarlı olan bölgelerdir.

2.7.2.1. Oral papillom

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 (40).

2.7.2.2. Respiratuvar Papillomatöz

Genellikle çocuklarda bazen genç yetişkinlerde, çok nadir olarak genital HPV tipleri solunum kanalını da infekte edebilmekte ve larinkste lezyonlar oluşturmaktadır. Laringeal papillomlar larinksin en iyi huylu epitelyal tümörüdür. Ancak solunum yolu tıkanmasına neden oldukları için çocukluk çağının en tehlikeli tümörlerindedir. Lezyonların büyük çoğunluğu eksternal genital siğillerle ilişkili olan HPV tipleriyle genellikle tip 6 ve 11 ile bağlantılıdır (5, 19).

2.7.2.3. Anogenital Siğiller

Genital kanalın pek çok enfeksiyonu subkliniktir. Birkaçı önemli klinik tablolara yol açar. Dış genital yüzeylerde, perineumda, vajinal iç yüzeyde, peniste ve anüste bulunan

büyük, nemli ve saplı yumuşak papillomlar; condyloma acuminatum, anogenital siğiller ve exophytic siğiller gibi isimlerle anılmaktadır. Yaklaşık % 90'ı HPV tip 6 ve 11 ile oluşur. Servikste ise tip 6 ve 11 tarafından oluşturulan düz siğiller (flat wart) ise Condyloma planum olarak isimlendirilmektedir (25, 40).

2.7.2.4. Vulvar, vajinal ve penis maligniteleri

Genital HPV, stratifiye skuamöz epitel içeren diğer genital bölgeleri de infekte edebilir. Diğer genital bölgelerdeki HPV ile ilişkili infeksiyon riski, servikal infeksiyon riski ile aynı orandadır. HPV DNA'sı vulva, vajina ve penis kanserine sebep olabilir. Buschke-Lowenstein tümörü olarak da adlandırılan dev condyloma accuminata düşük dereceli, penis dahil olmak üzere dış genital bölgeyi bölgesel olarak kaplayan skuamöz hücre karsinomasıdır (5, 25, 36).

2.7.2.5. Servikal displazi ve neoplazi

HPV infeksiyonlarının seksüel aktif kadın popülasyonunda servikal kanser biyopsilerinin yaklaşık % 84-100'ünde tespit edilmesi, bir zamanlar HPV'nin servikal kanseri başlatan olay olduğunu düşündürürken, şimdilerde kanser gelişiminde en önemli etkenlerden biri olduğu gösterilmiştir. HPV epiteliotropik bir virüs olup tüm dünyada servikal kanserin primer etyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir.

Dünyada her yıl 470.000'den fazla yeni servikal kanser vakası tanımlanmakta ve servikal kansere bağlı yaklaşık 274.000 ölüm bildirilmektedir. Servikal kanser vakalarının %75-80'i servikal kanser tarama programlarının etkili bir şekilde yapılmadığı veya uygulanmadığı gelişmekte olan ülkelerde görülür. Servikal kanser, prekanseröz lezyonlarının tespiti ve tedavisi ile büyük oranda önlenebilir bir hastalıktır. Erken tanı etkilidir, çünkü prekanseröz lezyonlar invaziv kansere çok yavaş, genellikle 10 yıldan uzun bir sürede ilerler (12, 23).

Servikal kanser, skuamöz intraepitelyal lezyon (SIL) veya servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) olarak tanımlanan prekanseröz lezyonlardan gelişir. Servikal prekanseröz lezyonlar sitolojik tarama testi olan Papanicolau (Pap) testi kullanılarak servikal hücrelerin analizi ile tespit edilebilir (39). Hücrelerde HPV infeksiyonuna bağlı sitopatik etkiler görülebilir. Prekanseröz lezyonlar epitelyumdaki atipik değişikliklere göre düşük grade (low grade SIL; LSIL) ve yüksek grade (high grade SIL; HSIL) skuamöz intaepitelyal lezyonlar olarak gruplandırılır. Servikal prekanseröz lezyonların diğer bir histolojik sınıflandırmasında CIN 1 hafif displazi, CIN 2 orta displazi ve CIN 3 ağır dizplazi ve karsinoma in situ lezyonlarına karşılık gelir (23).

Servikal ve vajinal patolojik değişikleri rapor etmek için Bethesda sistemi, 1990'ların ortasında geliştirilmiş ve 2001 yılında revize edilerek serviks kanseri prekürsör lezyonları, histoloji ile belirlenmiş invaziv hastalık progresyon riskine göre tanımlanmış sitolojik gruplar olarak sınıflandırmıştır. 2001 Bethesda sistemi tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo II: Servikal Sitolojik Tanı için 2001 Bethesda Sistemi

İntraepitelyal lezyon ya da malignite açısından negatif

Epitelyal hücre anormalliği

A- Skuamoz hücreler

I. Atipik skuamoz hücreler (ASC)

1. Önemi belirlenemeyen ASC (ASC-US)

2. ASC, HSIL tanısı dışlanamayan (ASC-H)

II. Düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (LSIL)

III. Yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (HSIL)

IV. Skuamoz hücre karsinomu

B- Glandüler hücreler

I. Atipik glandüler hücreler (AGC)

1. Endoservikal,

2. Endometrial

3. Glandüler hücreler

II. Atipik glandüler hücreler, neoplastiğe benzeyen

III. Endoservikal adenokarsinoma in situ (AIS)

IV. Adenokarsinoma

Gelişmiş ülkelerde Pap testinin yaklaşık 50 yıldır kullanılması ile servikal prekanseröz lezyonların erken tanısı ve tedavisi sonucu servikal kanserin insidans ve mortalitesinde önemli düşüş görülmüştür (12). Servikal kanser insidansının % 50-70 oranında azalmasına karşılık bu sonuç beklenenin çok altındadır. Şimdiye kadar herhangi bir popülasyondan servikal kanserin tam olarak eradike edilememesinin en önemli sebebi HSIL tanısı için Pap testinin sensitivitesinin oldukça düşük, %50-70 arasında olmasıdır. Testin düşük sensitivitesinin yanısıra diğer bir dezavantajı ise %5-70 arasında değişen oranlarda yalancı pozitif raporlar elde edilmesidir. Yalancı pozitif sonuçların çoğu ASCUS denilen grupta tanınmaktadır. Diğer taraftan Pap testi genellikle 20-65 yaş arası kadınlara yapılmakta olup bu kadınların gerçekte % 10'undan azında persistan HPV infeksiyonu gelişir (23).

Servikal kanser ve prekürsör lezyonların %99.7'sinde HPV DNA tespit edilmiştir (30). HPV infeksiyonu ve servikal kanser arasındaki kuvvetli etyolojik ilişki HPV testinin servikal kanser taramasında sitolojiye ilaveten yardımcı bir tarama testi olarak veya Pap

testi yerine alternatif olarak tek başına bir tarama testi olarak değerlendirilmesine yol açmıştır (12, 23).

2.8. Tanı

HPV infeksiyonlarının çoğunda klinik belirti görülmez, latent veya subklinik infeksiyonlar yaygındır. Bu nedenle HPV infeksiyonlarının tanısında virolojik tanı metodları kullanılır.

HPV hücre kültürü veya laboratuvar hayvanlarında üretilemez. Serolojik testler ise yeterince duyarlı değildir. İmmun cevapta majör kapsit proteinlerine karşı gelişen antikorlar uzun yıllar tespit edilebilir düzeyde kaldığından serolojik testler akut ve geçirilmiş infeksiyonları ayırt etmek için uygun değildir (23, 41).

HPV ile infekte hücrelerde immunohistokimyasal yöntemlerle HPV kapsit antijenlerinin tespiti ise sadece prodüktif HPV infeksiyonu varsa mümkündür, ancak yeterince sensitif değildir.

Ayrıca sitolojik inceleme ile eksfoliy hücre ve doku örneklerinde prodüktif HPV infeksiyonunun oluşturduğu yüzeysel tabakalarda sitoplazmik vakuolizasyon, perinükleer halo ve genellikle büyük, hiperkromatik nükleus ile karakterize 'koilositozis' denilen sitopatik etki tespit edilirse de sensitivitesi düşüktür (23).

Bu sebeple HPV infeksiyonunun tanısı öncelikle viral nükleik asitin tespitine dayanır. HPV DNA sekans analizi tanıda altın standarttır. Bununla beraber maliyeti yüksek, çalışması uzun sürdüğü ve birden fazla HPV tipiyle infeksiyon olduğunda klinik örnekten çalışması zor bir yöntem olduğu için günümüzde sıklıkla solid faz hibridizasyon temeline dayanan multiplex HPV genotipleme yöntemleri tercih edilmektedir (26, 41).

HPV infeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler tanı testleri üç grupta incelenebilir;

1- Hibridizasyon testleri

- İn situ hibridizasyon (ISH)
- Southern blot hibridizasyon (SBH)
- Dot blot hibridizasyon (DBH)
- Fluoresan in situ hibridizasyon (FISH)

2- Hybrid capture test (hibrid yakalama testi)

3- Polimeraz zincir reaksiyonu (polimerase chain reaction; PCR)

2.8.1. Konvansiyonel Hibridizasyon Testleri

HPV ile ilgili ilk çalışmalarda kullanılmıştır. ISH ile HPV DNA direk olarak hücre ve biyopsi örneklerinde tespit edilir. Bu metod intrasellüler HPV DNA ile spesifik propların

hibridizasyonuna dayanır. Bu testle virüsün hücredeki lokalizasyonu, hücrede entegre veya epizomal halde bulunup bulunmadığı tespit edilebilir.

Hibridizasyon testleri PCR ile kıyaslandığında sensitivitesi çok düşüktür. Bu testler genellikle araştırma amacıyla kullanılır, yapılması yorucu ve zaman alıcıdır. Fazla sayıda örneğin incelenmesi için uygun değildir, rutin olarak kullanılmaz (23, 41).

2.8.2. Sinyal Amplifikasyon Testleri

Hybrid Capture 1 (Digene) ve Hybrid Capture 2 (Digene) olmak üzere iki tipi mevcuttur. Hybrid Capture Tube test (HCT) olarak da bilinen Hybrid Capture 1 (HC1) testi tüpte yapılan non-radyoaktif sinyal amplifikasyon metodudur. Bu test ile 5 LR HPV ve 9 HR HPV tipi tanınmaktadır.

Hybrid Capture 2 (HC2) test, HC1 testinin mikroplak formatında geliştirilmiş versiyonudur. HR HPV tip sayısı 13'e yükselmiştir. HC 1'e göre 10 kez daha yüksek sensitiviteye sahiptir. İki farklı RNA prob kokteyli deneyde ayrı ayrı kullanılır ve böylece test örnekteki HPV DNA'nın sadece düşük veya yüksek risk grubunda olduğu hakkında bilgi verir, ancak spesifik HPV genotipi hakkında bilgi vermez. HC 2 testi servikal hücrelerin HPV testi için FDA (Food and Drug Administration) onayı almış bir metoddur (36, 41).

Yeni geliştirilen prototip Hybrid Capture 3 (Digene) testi HC2 testine benzer özelliktedir. HPV DNA ile hibridize olan aynı RNA problemleri kullanılır. Cut off değeri daha düşüktür (23).

2.8.3. PCR

En yaygın kullanılan hedef amplifikasyon metodudur. PCR testinin sensitivitesi ve spesifitesi PCR ürünlerinin uzunluğu, reaksiyonda kullanılan DNA polimeraz performansı, kullanılan primer seti ve reaksiyon şartları gibi faktörlere dayanarak değişir. PCR ile HPV DNA amplifikasyonu için çeşitli konsensus primer sistemleri mevcuttur. Konsensus PCR primerleri ile geniş spektrumda farklı HPV genotipleri amplifiye edilebilir. En çok seçilen protokol HPV genomunun son derece korunan bölgesi L1 genini hedef alan konsensus veya genel primerlerin kullanımınıdır (23).

2.8.4. HPV PCR Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi

Konsensus HPV primerleri ile yapılan PCR testi sonucu HPV pozitif bulunan örneklerde daha sonra spesifik HPV tipinin tespiti için hibridizasyon, dizi analizi, RFLP (restriction fragment length polymorphism) ve tip spesifik PCR (TS-PCR) gibi bir çok test kullanılır. Ancak servikal mukozayı enfekte eden 40'dan fazla HPV tipi bulunduğundan dolayı genotip tayini için her örneğe çok sayıda SBH hibridizasyon testi veya tip spesifik

PCR testinin yapılması zordur. Bu nedenle konsensüs PCR ile amplifikasyondan sonra spesifik HPV tiplerinin tayini için mikropakta hibridizasyon (PCR-ELISA) ve Line Probe Assay (LIPA), microarray/chip gibi alternatif genotipleme sistemleri geliştirilmiştir.

HPV genotiplemesi için reverse line blot hibridizasyon assay veya Line blot olarak da bilinen LIPA, naylon strip veya nitrosellülöz membran üzerine immobilize olmuş spesifik DNA problemleri ile PCR ampliconun hibridizasyonuna dayanır (23).

2.8.5. HPV Testinin Kullanımı

HPV testinin başlıca üç kullanım alanı vardır; servikal kanser taramasında 30 yaşın üstündeki kadınlarda Pap testi ile birlikte kullanımı, ASCUS tanısı alan kadınların yönlendirilmesinde ve tedavi sonrası kadınların takibinde kullanılmasıdır (23, 26).

HPV DNA testinin HSIL tespiti için sensitivitesi % 84-100 olup genellikle Pap testinin % 50-70 oranından oldukça yüksektir. Ancak HPV DNA testinin spesifitesi % 64-95 Pap testinin spesifitesi % 86-100 oranına benzer veya biraz daha düşüktür.

HR HPV testinin 30 yaş üstü kadınlarda yapılması ile risk altındakiler erken tanınır. 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 negatif HPV testinin negatif prediktif değeri % 99-100'dür. Bu nedenle HPV testinin servikal kanser taramasında kullanımı önemlidir (23).

2.9. Tedavi

HPV'nin deri ve mukozal infeksiyonlarında tedavi metodunun seçiminde hastanın yaşı, lezyonun şekli ve yeri, hastalık süresi, klinik tablonun yaygınlığı, hastanın immun sisteminin durumu dikkate alınır. Kriyoterapi, elektrokoter, kimyasal koterizasyon, cerrahi eksizyon, lazer tedavisi, podofilin, kantaridin veya salisilik asit kullanımı, lezyon içine interferon uygulanması ve topikal immunoterapi gibi çeşitli tedavi yöntemleri mevcuttur (36, 40, 42, 43).

2.10. Aşı

İlk kez 1970'li yılların başında HPV ile serviks kanseri ilişkisine değinildikten sonra, HPV'nin çeşitli tipleri, bunların neden olduğu hastalık tabloları, etkenin onkojen özelliği ve immunosupresör etkisi ayrıntılı olarak kanıtlanmış ve aynı dönemde başlayan aşı çalışmaları 2006 yılında tamamlanarak ilk Papillomavirus aşısı Haziran 2006 tarihinde FDA onayı almıştır. Günümüzde sayıları 140'ı aşan HPV genotiplerinden 40 kadarı genital sistemi tutmakta olup, bunlardan en az 15'nin serviks kanserlerinin % 99'dan fazlasında sorumlu olduğu gösterilmiştir. Söz konusu tablonun % 50-60'ında tip 16, yaklaşık % 10-20'sinde ise tip 18 etken olarak bulunmaktadır. Ayrıca aynı genotiplerin

serviks dışı bazı kanser türlerinde de (vulvar, anal, penil, orofarengeal) saptanmaları aşı çalışmalarının ağırlıklı olarak bu iki genotip üzerinde odaklaşmasına yol açmıştır.

Servikal kanseri önlemede en akılcı yaklaşımın düzenli jinekolojik kontroller ve gerektiğinde prekanseröz lezyonların tedavisi ile yapılabileceği kabul edilmektedir. Ancak bu tip bir uygulama infeksiyonun yaygın olduğu, buna karşın tarama ve tedavi stratejilerinin özellikle parasal nedenlerle rutine sokulamadığı gelişmekte olan ülkelerde hayata geçirilememiştir. Gelişmiş ülkelerde kadınların % 40-85'i, gelişmekte olan ülkelerde ise %5'i servikal kanser tarama programlarına katılmaktadırlar (23).

HPV infeksiyonlarının doğal seyrine bakıldığında, bu infeksiyonun ve oluşturduğu lezyonların immun yanıtın etkisine bağlı olarak zamanla ortadan kayboldukları görülmektedir. 20'li yaşlarda HPV ile enfekte olan kadınların ortalama %8'inde 20-30 yıllık bir süreç sonunda viral persistans görülmektedir. Bu tür bir eradikasyondan büyük oranda Th1 tipi hücresel yanıt ile, kısmen de olsa L1 proteinin konformasyonel epitoplarına karşı oluşan nötralizan antikorlar sorumludur. Bu nedenle HPV'ye karşı geliştirilmesi hedeflenen;

- a- Henüz etkenle karşılaşmamış bireylere uygulanacak profilaktik aşılarla nötralizan antikorların,
- b- Daha önce enfekte olmuş kişilere uygulanacak olan terapötik aşılarla ise hücresel yanıtı sağlayacak sitotoksik T lenfositlerinin uyarılması amaçlanmıştır (36).

HPV aşısı ile ilgili çalışmalarda çeşitli ökaryot hücre modellerinde ekspresse ettirilen virüs benzeri partiküller (virüs-like particles, VLP) ile olumlu sonuçlar elde edilmiştir. İçlerinde nükleik asit taşıyamaları nedeniyle tehlike arz etmeyen VLP'ler morfolojik olarak gerçek virionlara benzemektedirler ve güçlü antikor yanıtına yol açarlar (23, 34, 44).

Günümüzde iki üretici kuruluşun HPV aşısı lisans alarak satışa sunulmuştur;

- 1- Glaxo Smith Kline (GSK) tarafından hazırlanan ve Baculovirusların vektör olarak kullanıldığı bivalent (tip 16 ve 18) aşı: Cervarix
- 2- Merck tarafından hazırlanan ve Saccharomyces cerevisiae'de üretilen quadrivalent (tip 6, 11, 16 ve 18) aşı. Gardasil (12, 34, 35)

HPV aşısının etken virüsle temastan önce uygulanması gerekir. Her ülke kendi verilerine göre hedef yaş grubunu belirlemektedir. Örneğin ABD'de HPV aşısı 11-12 yaşlarındaki tüm kız çocuklarına önerilirken (39), Almanya'da aşı 12-17 yaş grubuna uygulanmaktadır. Ülkemizde ise HPV aşısı 10-25 yaş arası kız çocukları ve kadınlarda endikedir (23, 12).

Yakın zamanda 26 yaş üstü kadınlar ile erkek çocukların bağışıklanması konusunda yapılan çalışmalar sonucunda Avustralya gibi bazı ülkeler erkek çocukları da rutin bağışıklama programlarına almış ve aşının uygulanacağı üst yaş sınırını 55'e yükseltmiştir.

HPV aşısı üç doz olarak kas içi yoldan uygulanır. Uygulanan bölgedeki lokal yanmalar dışında herhangi bir ciddi yan etkiye yol açmaz. HPV aşısı uygulananlarda ortalama altı yıl sonra yüksek titrede antikor yanıtının varlığı gösterilmiştir. Aşının uzun yıllar koruma sağladığı ve büyük olasılıkla rapel doz uygulamasına gerek olmadığı kabul edilmektedir (23, 44).

HPV aşıları immün sistemi uyarmada doğal virüs infeksiyonundan daha etkilidir. Çünkü aşılar intramüsküler uygulanmaktadır. Böylece antijen sunan hücreleri daha güçlü uyarmaktadır. Doğal infeksiyon ise epitele sınırlı kaldığından immün sistem hücreleri ile zayıf bir iletişim olmaktadır (34).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza Mayıs 2010–2011 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi ve Konya Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi Kadın Doğum Polikliniklerine başvuran 180 hasta dahil edildi. Çalışmaya 21-81 yaşları arasında cinsel yönden aktif hastalar alındı. Geçirilmiş histerektomi, servikal stenoz veya gebeliği bulunan olgular çalışmaya dahil edilmedi.

Çalışma grubundaki hastaların yaş, medeni durum, parite, ilk cinsel ilişki yaşı, partner sayısı, sigara kullanımı, kondom kullanımı ve oral kontraseptif kullanımı ile ilgili bilgileri kaydedildi.

Çalışmamız 10102006 nolu projeye Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiş, fakültemiz Etik kurulunun 25.11.2009 tarih ve 2009/050 sayılı kararı ile onay almıştır.

3.1. Örneklerin Alınması

Servikal sürüntü örneği almak için gerekli eküvyon ve taşıma besiyeri Kadın Doğum Kliniklerine dağıtıldı. İlgili hekimlere konu hakkında bilgilendirme yapıldı.

Polikliniğe başvuran ve çalışmamıza uygun olan hastalardan rutin jinekolojik muayene sırasında Pap smear ve HPV DNA için servikal örnekler alındı. Örnek alınmadan önce hastalara örneğin nasıl alınacağı konusunda bilgi verildi ve bu konuda onamları alındı.

Pap smear testi için servikal fırça ile alınan sürüntü örneği lam üzerine yayılıp fikse edilerek incelenmek üzere hastanemizin Patoloji Laboratuvarı'na gönderildi. Örnekler Papanicolaou (Pap) boyası ile boyanıp Bethesda 2001 terminoloji sistemi esas alınarak değerlendirildi.

Endoservikal kanaldan ve tüm transformasyon bölgesinden alınan sürüntü örnekleri Stuart's taşıma besiyerine (Copan, Brescia, İtalya) konuldu ve HPV DNA saptanması için hastanemizin Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ulaştırıldı ve örnekler çalışma yapılincaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.2. Papanicolaou boyama yöntemi

Patoloji Laboratuvarı'na ulaştırılan örnekler Papanicolaou (Pap) boyama yöntemiyle boyandı. Pap boyası; Papanicolaou'nun geliştirdiği multikromatik boyama tekniğidir ve Haris Hematoksilen, orange G ve EA(eosin azure) boyalarından oluşur. Sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı:

- %95'lik etil alkolde tespit edilmiş yaymalar, azalan derecelerde alkolden(%96, %70 ve %50) geçirildi.

- Yaymalar çeşme suyunda 1 dakika yıkandıktan sonra Harris hematoksisleninde ortalama 3 dakika boyandı.
- Lamlar, çeşme suyunda yıkanarak fazla boya giderildi.
- Yaymalar artan konsantrasyonlu alkollerden (%50, %70 ve 2 defa %96) sırayla geçirildikten sonra Orange G'de ortalama 5 dakika boyandı.
- %96 alkolde 2 defa çalkalandı.
- İstenilen boya koyuluğuna erişilinceye kadar EA 50'de ortalama 5 dakika boyandı.
- %96 alkolde 2 defa, %100 alkolde 1 defa çalkalanıp kurutulduktan sonra ksilolde berraklaştırıldı.
- Prepatların yayma/smear olmayan yüzü gazlı bezle silindi. Yayma üzerine 1-2 damla Kanada balzamu/entelland damlatılarak hava kabarcığı oluşturmadan lamelle kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi.

3.3. DNA izolasyonu

Çalışma yapılacağı gün örnekler oda ısısına getirildi. HPV DNA tespiti ve tiplendirmesi için öncelikle örneklerden DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu için High Pure Viral Nucleic Acid kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Bu işlem için örnek alınan eküvyonlar 0.5 ml steril distile suda 10 dk bekletildi. Bu sıvıdan izolasyon yapıldı.

Çalışmaya şu şekilde devam edildi:

- 1.5 ml'lik steril ependorf tüp içerisine 200 µl poly A çalışma reaktifi, 50 µl Proteinaz K ve 200 µl örnek konuldu.
- Tüpler 72 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra üzerine 100 µl bağlanma tamponu eklendi.
- İnkübasyon sonunda ependorf tüpteki materyal filtreli tüplere aktarıldı.
- Filtreli tüpler 1 dk 8000 xg de santrifüj edildikten sonra tüpün altında bulunan toplama tüpleri yenisi ile değiştirildi
- Üzerine 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu eklendi.
- 1 dk boyunca 8000 xg'de santrifüj edildikten sonra tüpün altında bulunan toplama tüpleri yenisi ile değiştirildi.
- Üzerine 450 µl yıkama tamponu eklendikten sonra tekrar santrifüj edildi.
- Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı.
- Filtreli tüpler 1 dk 13 000 xg'de santrifüj edildikten sonra toplama tüpleri 1,5 ml'lik steril ependorf tüp ile değiştirildi.

- 72 °C’de ısıtılmış 50 µl elüsyon buffer eklendi. 1 dk 8000 xg’de santrifüjden sonra ependorf tüplerde biriken sıvı amplifikasyon için kullanılmak üzere saklandı.

3.4. Amplifikasyon

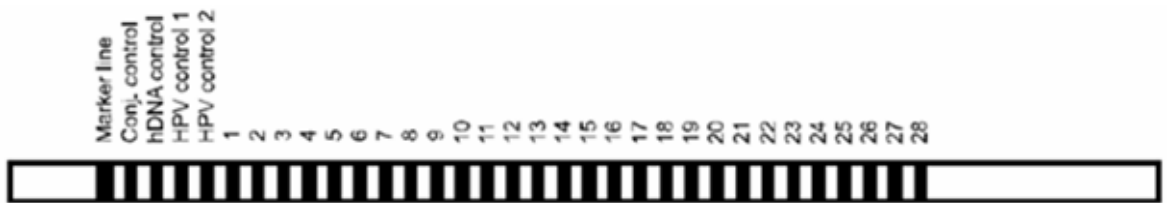
Amplifikasyon için INNO-LİPA HPV Genotyping Extra Amp (INNOGENETICS N. V., Belçika) kiti kullanıldı. INNO-LİPA ters hibridizasyon prensibine dayanmaktadır. Bu test ile 28 farklı HPV gen bölgesi tanımlanabilir. Biotinle işaretli short PCR fragment 10 (SPF 10) primerleri kullanılarak HPV’nin en iyi korunan L1 gen bölgesindeki 65 bp’lik genomu çoğaltılır. Aynı zamanda örneğin kalitesini ve ekstraksiyonunu göstermek amacıyla insan HLA-DPB1 genini çoğaltan bir çift primer kullanılır.

Amplifikasyon işleminde;

- Her bir örnek için 37,7 µl Amp mix ve 2,3 Enz mix ile bir karışım hazırlandı.
 - 1.Amp mix içeriği: dNTP/dUTP ile biotinli primer karışımı, MgCl₂, 0,05 NaN₃
 - 2.Enz mix içeriği: Biotinle işaretli AmpliTaq Gold DNA polimeraz, urasil-N-glikozilaz
- 0,2 ml’lik PCR tüplerine bu karışımdan 40 µl pipetlendi.
- Üzerine izole edilen DNA karışımından 10 µl eklendi.
- Bu elde ettiğimiz karışım SensoQuest Labcycler (SensoQuest GmbH, Göttingen, Almanya) cihazına yerleştirildi ve aşağıda belirtilen amplifikasyon programı uygulandı:

Dekontaminasyon	37°C’de	10 dakika	
Denatürasyon	94°C’de	9 dakika	
Denatürasyon	94°C’de	30 saniye	} 40 siklus
Primer bağlanması	52°C’de	45 saniye	
Primer uzaması	72°C’de	45 saniye	

PCR ampliconları nitrosellöz banttaki yakalayıcı spesifik oligonükleotid proplara hibridize edilir. Proplar birbirine paralel çizgiler halinde bir membran strip üzerine yapııştırılmıştır. Strip üzerinde spesifik DNA sekansını gösteren 28 çizgi ve aynı zamanda 4 kontrol çizgisi bulunmaktadır.



Şekil II: LİPA stribi

İlk çizgi konjugat kontrol çizgisidir. Konjugat ve substrat solüsyonlarının reaktif olduğunu gösterir. Bu çizgi her zaman pozitif olmalıdır.

İkinci çizgi insan DNA'sı kontrol çizgisidir. Alınan örneğin kalitesini ve ekstraksiyonun etkinliğini gösterir. Örnekteki HPV DNA'nın çok yüksek düzeyde pozitif olduğu durumlar dışında bu çizgi her zaman pozitif olmalıdır.

Alınan örnek HPV DNA açısından pozitif ise tip spesifik çizgilerden biri veya HPV kontrol çizgilerinden biri pozitif olmalıdır.

3.5. Hibridizasyon

Hibridizasyon için aşağıdaki işlemler yapıldı:

- Hibridizasyon solüsyonu ve yıkama solüsyonu 37 °C'ye ısıtıldı.
- Her örnek için bir test küveti, bir strip kullanıldı.
- Her küvete 10 µl denatürasyon solüsyonu eklendi.
- Bu solüsyona biotinle işaretli 10 µl amplifiye edilmiş ürün eklendi.
- Oda ısısında (20-25 °C'de) 5 dk beklendi.
- Daha önceden ısıtılan hibridizasyon solüsyonundan 2 ml eklendi.
- Her küvetin içine birer strip yerleştirildi.
- Hazırlanan küvetler su havuzunda 49 °C'de 80 rpm'de çalkalanarak 60 dk inkübe edildi.

3.6. Yıkama

- Hibridizasyondan sonra su havuzundaki küvetler çıkarıldı. Üzerinde sıvı bir pipet yardımıyla aspire edildi.
- Daha önceden ısıtılmış yıkama solüsyonundan 2 ml eklendi.
- Oda ısısında 10-20 sn çalkalandı.
- Küvetteki solüsyon aspire edildikten sonra yıkama işlemi tekrar edildi.
- Son basamakta her küvete 2 ml yıkama solüsyonu eklenerek su havuzunda 49 °C'de 30 dk inkübe edildi.

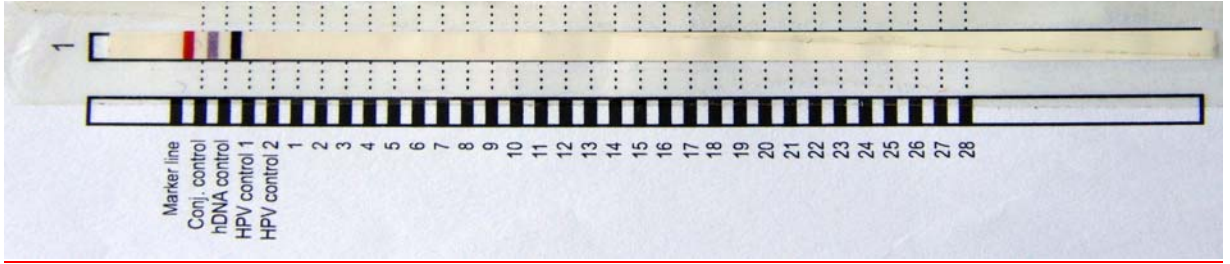
3.7. Renk Oluşumunun Gözlenmesi

- İnkübasyondan sonra her strip iki kere 2 ml'lik dilüe Rinse solüsyonu ile yıkandı.
- Üzerine alkalın fosfotaz-streptavidin kompleksi içeren 2 ml konjugat eklendikten sonra 30 dk inkübe edildi.
- Her strip iki kere dilüe Rinse solüsyonu ile tekrar yıkandı.
- Her küvete 5-bromo-4-chromo-3-indolfosfat (BCIP) ve Nitro Blue Tetrazolium (NBT) içeren kromojenik substrat eklendi.

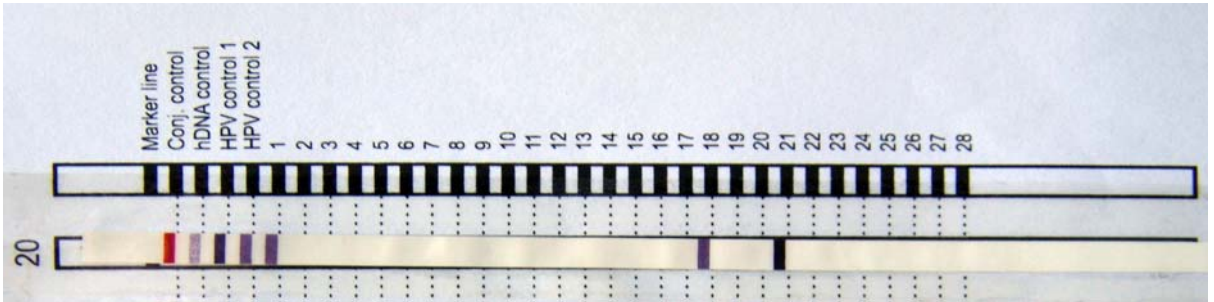
- 30 dk inkübe edildi.
- Substratın konjugata bağlanması ile alkalın fosfotaz enzimi aktivasyonu sonucunda nitrosellöz bant üzerinde kromojenik bant oluşumu gözlemlendi.
- Stripler iki kere distile su ile 3 dk boyunca yıkanarak bu basamak sonlandırıldı.
- Küvetten çıkarılan strip kurutulduktan sonra veri değerlendirme kağıdı üzerine yapıştırıldı.

3.8. Değerlendirme

Sonuçların değerlendirilmesi INNO-LİPA HPV Genotyping Extra Okuma Kartı yardımıyla gözle yapılmıştır. İlk dördü kontrol çizgisi olmak üzere strip üzerinde farklı oligonükleotid problemlerinin yapıştırıldığı çizgiler bulunmaktadır. Strip üzerinde mor veya kahverengi bant oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.



Resim I: HPV negatif örneğin LİPA stribindeki görüntüsü (Çalışmamızdan)



Resim II: HPV pozitif örneğin LİPA stribindeki görüntüsü (Çalışmamızdan)

3.9. Kalite kontrolü

Her çalışma sırasında bir pozitif bir de negatif kontrol kullanıldı. Pozitif kontrol HPV6 ve HLA-DPB1 içermekteydi.

3.10. İstatistik

Kayıtlar ve istatistiksel analiz için The Statistical Program for Social Sciences (SPSS, version 13.0) programı kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya Mayıs 2010–2011 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi ve Konya Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi Kadın Doğum Polikliniklerine başvuran 180 hasta alındı. Hastaların yaşları 21-81 arasında olup yaş ortalaması $38,6 \pm 10,3$ olarak saptandı.

Bu hastaların % 18,9’unda (n=34) HPV DNA pozitif, % 81,1’inde (n=146) HPV DNA negatif bulunmuştur. HPV tiplerinin dağılımı tablo III’de gösterilmiştir.

Onkojenik risk potansiyeline göre HPV dağılımı incelendiğinde; tiplerin %16.8’i düşük riskli, %12.4’ü muhtemel yüksek riskli, %70.7’si yüksek riskli HPV grubundan bulundu. Birden fazla HPV tipiyle infekte 8 hasta bulunmaktaydı. Bu hastaların infekte olduğu tipler tablo IV’de gösterilmiştir.

Tablo III: HPV tiplerinin dağılımı

HPV tipi	n (sayı)	% (yüzde)
16	10	20.8
51	10	20.8
6	6	12.6
52	4	8.3
53	4	8.3
33	3	6.3
31	2	4.1
45	2	4.1
66	2	4.1
18	1	2.1
11	1	2.1
44	1	2.1
56	1	2.1
82	1	2.1

Tablo IV: Birden fazla HPV tipiyle infekte hastalar

HPV tipi	n (sayı)	% (yüzde)
16, 18, 51, 45	1	12,5
31, 33, 51, 53	1	12,5
6, 52, 53	1	12,5
31, 33, 44	1	12,5
51, 56	1	12,5
53, 82	1	12,5
6, 16	1	12,5
6, 66	1	12,5

Çalışmaya alınan hastaların patoloji sonuçlarının dağılımı ise şu şekildeydi; 92 hasta (%51,1) normal, 71 hasta (% 39,4) ASCUS, 4 hasta (% 2,2) AGUS, 3 hasta (% 1,7) ASC-H, 2 hasta (1,1) LSIL, 2 hasta (% 1,1) HSIL idi (Tablo V).

Tablo V: Smear sonuçlarına göre HPV DNA pozitifliği

Smear sonucu	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam	
	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)
Normal	15	16.3	77	83.7	92	51,1
ASCUS	12	16.9	59	83.1	71	39,4
AGUS	1	25	3	75	4	2,2
ASC-H	1	33.3	2	66.7	3	1,7
LSIL	1	50	1	50	2	1,1
HSIL	2	100	0	0	2	1,1

Çalışmamızda aynı zamanda kondilomu olan 6 hastanın 2'sinde (%33.3) HPV DNA pozitifliği elde edilmiştir.

24 yaş ve altında 7 hasta (% 3,9), 25-34 yaş arasında 59 hasta (% 32,8), 35-44 yaş arası 66 hasta (% 36,7), 45-54 yaş arası 37 hasta (% 20,6), 55 yaş ve üzerinde 11 hasta (% 6,1) bulunmaktaydı. Araştırmaya katılan hastaların yaş gruplarına göre HPV DNA pozitifliği dağılımı tablo VI'de gösterilmiştir.

Tablo VI: Yaş gruplarına göre HPV DNA pozitifliği

Yaş grupları	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam	
	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)
24 ve altı	1	14,3	6	85,7	7	3,9
25-34	8	13,6	51	86,4	59	32,8
35-44	14	21,2	52	78,8	66	36,7
45-54	8	21,6	29	78,4	37	20,6
55 ve üstü	3	27,3	8	72,7	11	6,1
Toplam	34	18,9	146	81,1	180	100

Pearson Chi-square değeri= 2.108, Serbestlik derecesi= 4, p=0.716

Yaş grupları ile HPV DNA pozitifliği arasındaki sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (p>0,05).

Çalışmaya alınan hastaların % 95'i (n=171) evli, % 5'i (n=9) bekar veya dul idi (Tablo VII) .

Tablo VII: Hastaların medeni durumlarına göre HPV DNA pozitifliği

Medeni durum	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam	
	n (sayı)	% (yüzde)	N (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)
Evli	29	17	142	83	171	95
Bekar/Dul	5	55,6	4	44,4	9	5
Toplam	34	18,9	146	81,1	180	100

Pearson Chi-square değeri= 8.313, Serbestlik derecesi= 1, p=0.004

Hastaların medeni durumu ile HPV DNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p<0.05). Bekar veya dul olanlarda HPV DNA pozitiflik oranı evli olanlara göre daha fazla bulundu.

Hastaların ilk cinsel ilişki yaşı ortalaması 20,7±3,5 idi. 5 hastanın (% 2,8) ilk cinsel ilişki yaşı 15 yaş ve altında, 65 hastanın (% 36,1) ilk cinsel ilişki yaşı 16-19 yaş arası, 110 hastanın (% 61,1) ilk cinsel ilişki yaşı 20 yaş ve üzerinde idi. Araştırmaya katılan hastaların ilk cinsel ilişki yaşına göre HPV DNA pozitifliği Tablo VIII'de gösterilmiştir.

Tablo VIII: Hastaların ilk cinsel ilişki yaşına göre HPV DNA pozitifliği

	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam	
	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)
İlk cinsel ilişki yaşı						
15 yaş ve altı	3	60	2	40	5	2,8
16-19 yaş	15	23.1	50	76.9	65	36,1
20 yaş ve üstü	16	14.5	94	85.5	110	61,1
Toplam	34	18.9	146	81.1	180	100

Pearson Chi-square değeri= 7.614, Serbestlik derecesi= 2, p=0.022

Hastaların ilk cinsel ilişki yaşı ile HPV DNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p<0.05). İlk cinsel ilişki yaşı 19 yaş ve altında olanlarda 20 yaş ve üstünde olanlara göre daha yüksek oranda HPV DNA pozitif bulundu.

Cinsel yaşam anamnezinde 172 hastanın (% 95,6) 1 partneri, 7 hastanın (% 3,9) 2 partneri, 1 hastanın (% 0,6) 3 partneri bulunmaktaydı (Tablo:IX).

Tablo IX: Hastaların partner sayısına göre HPV DNA pozitifliği

	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam	
	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)
Partner sayısı						
1	31	18	141	82	172	95,6
2	2	28,6	5	71,4	7	3,9
3	1	100	0	0	1	0,6
Toplam	34	18,9	146	81,1	180	100

Pearson Chi-square değeri= 4.807, Serbestlik derecesi= 2, p=0.09

Hastaların partner sayısı ile HPV DNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p>0.05).

Çalışmaya alınan hastaların doğum sayısı ortalaması 2,72 olup 93 hasta (% 51,7) 1 ve altında, 68 hasta (% 37,8) 2-3 arasında, 19 hasta (% 10,6) 4 ve üzerinde doğum yapmıştı. Hastaların doğum sayısı ile HPV DNA pozitifliği arasındaki ilişki Tablo X'da gösterilmiştir.

Tablo X: Hastaların doğum sayısına göre HPV DNA pozitifliği

	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam	
	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)
Doğum sayısı						
1 ve altında	16	17,2	77	82,8	93	51,7
2-3	11	16,2	57	83,8	68	37,8
4 ve üzeri	7	36,8	12	63,2	19	10,6
Toplam	34	18,9	146	81,1	180	100

Pearson Chi-square değeri= 4.496, Serbestlik derecesi= 2, p=0.106

Doğum sayısı ile HPV DNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p>0.05).

Hastaların % 15,6'sı (n=28) sigara içmekte, % 84,4'ü (n=152) sigara içmemektedir (Tablo:XI). Çalışmaya alınan hastaların % 16,7'si (n=30) kondom kullanmakta iken % 6,1'i (n=11) oral kontraseptif kullanmakta idi. Tablo XII'de kondom kullanımı, tablo XIII'de oral kontraseptif kullanımı ile HPV DNA pozitifliği arasındaki ilişki gösterilmiştir.

Tablo XI: Hastaların sigara kullanımına göre HPV DNA pozitifliği

	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam	
	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)
Sigara kullanımı						
Var	7	25	21	75	28	15,6
Yok	27	17,8	125	82,2	152	84,4
Toplam	34	18,9	146	81,1	180	100

Pearson Chi-square değeri= 0.808, Serbestlik derecesi= 1, p=0.369

Hastaların sigara kullanımı ile HPV DNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p>0.05).

Tablo XII: Hastaların kondom kullanımına göre HPV DNA pozitifliği

	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam	
	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)
Kondom kullanımı						
Var	2	6,7	28	93,3	30	16,7
Yok	32	21,3	118	78,7	150	83,3
Toplam	34	18,9	146	81,1	180	100

Pearson Chi-square değeri=3.510, Serbestlik derecesi= 1, p=0.061

Kondom kullanımı olmayan hastalarda HPV DNA pozitifliğinin kondom kullananlara oranla daha fazla olduğu tespit edilmiş, fakat sonuçlar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Tablo XII: Hastaların oral kontraseptif kullanımına göre HPV DNA pozitifliği

	HPV DNA pozitif		HPV DNA negatif		Toplam	
	n (sayı)	% (yüzde)	N (sayı)	% (yüzde)	n (sayı)	% (yüzde)
Oral kontraseptif kullanımı						
Var	2	18,2	9	81,8	11	6,1
Yok	32	18,9	137	81,1	169	93,9
Toplam	34	18,9	146	81,1	180	100

Pearson Chi-square değeri=0.004, Serbestlik derecesi= 1, $p=0.951$

Oral kontraseptif kullanımı ile HPV DNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Human Papillomavirus sık genital infeksiyonlara neden olup, genç, seksüel aktif insanlarda ve çoğunlukla asemptomatik olarak bulunmaktadır. Genital sistem HPV infeksiyonunun alt genital sistem malignensileri, özellikle servikal kanserle ilişkisi bir çok moleküler, deneysel, epidemiyolojik ve klinik verilerle gösterilmiştir (45). Servikal kanser tüm dünyada kadınlar arasında ikinci en sık görülen kanserdir (23).

Sağlık Bakanlığı, 2006-2008 istatistik verilerine göre Türkiye'deki servikal kanser insidansı yaklaşık olarak 4.4-4.8/100.000 olup, görülme sıklığı açısından 10. sırada yer almaktadır (46). Globocan (Dünya Sağlık Örgütü Kanser Araştırma Birimi) verilerine göre de serviks kanseri ülkemizde kadınlarda kanserden ölümler arasında 7. sıradadır (47).

Serviks kanseri açısından risk taşıyan kişilerin belirlenmesi ve uygun klinik takibin gerçekleşmesi için tarama programlarına ek olarak kişideki HPV infeksiyonunun varlığının araştırılması ve etken olan HPV tipinin belirlenmesi önem taşımaktadır (48, 49).

Bu amaçla ülkemizde de bu konu ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Dursun ve ark. jinekoloji polikliniğine başvuran 403 hasta ile yaptıkları bir çalışmada HPV prevalansını ve tiplerini araştırmışlardır. Bu çalışmada hastaların 93'ü (%23.1) anormal sitolojili ve 310 (%76.9) hastanın ise smear sonucu normal bulunmuş. Çalışmada toplam HPV prevalansı %23.1 olarak saptanmıştır. Pap smear sonucu anormal olan hastalarda (% 22 ASCUS, %51 LSIL, %60 HSIL) ise prevalans % 36 olmuştur (50).

Ergünay ve ark. 2006 yılında Hacettepe Üniversitesi'nde yaptıkları bir çalışmada rutin sitolojik incelemesinde atipi saptanan hastalarda PCR yöntemiyle HPV DNA varlığını ve tiplerini araştırmışlardır. Çalışmaya 14'ü ASCUS, 1'i AGUS 3'ü ASC-H, 5'i HSIL, 7'si LSIL, 4'ü LSIL+ şüpheli HSIL, 1'i doğası belirsiz atipik hücreler olmak üzere toplam 35 olgu dahil edilmiştir. 35 örneğin 28'inde (%80) HPV DNA pozitifliği elde edilmiş, ASCUS ve ASC-H olgularından oluşan 7 kişide (%20) pozitiflik belirlenememiştir. Örneklerin % 78.6'sında yüksek riskli HPV tipleri, % 7.1'inde muhtemel yüksek riskli tipler % 14.3'ünde düşük riskli tipler tanımlanmıştır. HPV tip 16 en sık izlenen tip olmuş (% 50) , onu örneklerin % 10.7'sinde saptanan tip 18 ve % 7.1'inde saptanan tip 53 takip etmiştir (48). Bizim çalışmamıza 92'si normal sitolojili, 71'i ASCUS, 4'ü AGUS, 3'ü ASC-H, 2'si LSIL, 2'si HSIL olan ve 6'sı kondilomlu olan 180 hasta dahil edilmiştir. Çalışmamızda hastaların 34'ünde (% 18.9) HPV DNA bulunmuştur. HPV tiplerinin onkojenik risk potansiyeline göre dağılımı ise şu şekildedir; % 70.7 yüksek riskli, %12.4 muhtemel yüksek riskli ve % 16.8 düşük riskli HPV.

Yavuzer ve ark. tarafından yapılan benzer bir çalışma ise serviks kanseri ve CIN tanısı almış 50 servikal doku örneğinde HPV DNA varlığı araştırılmış, % 70'inde (35 olgu) sonuç pozitif olarak bulunmuştur. En sık görülen üç HPV tipi sırasıyla tip 6/11 (42.9), tip 16 (% 22.9), tip 18 (% 14.3) iken iki HPV tipiyle infekte 7 olgu (%20) gözlenmiştir. Bu çalışmadaki HPV prevalansı ve tip dağılımı literatürde bildirilenlere göre farklı bulunmuş, araştırmacılar bu durumu HPV sıklığı ve dağılımındaki coğrafi farklılıklara ve olgu sayısının sınırlı olmasına bağlamışlardır (51).

Dinç ve ark. Gazi Üniversitesi Jinekoloji Polikliniğine başvuran 50 kolposkopisi negatif, 52 kolposkopisi pozitif 102 hastada L1 gen bölgesini hedef alan real time PCR ile HPV 16 ve diğer HPV tiplerinin varlığını araştırmışlar, kolposkopi sonucu pozitif ve negatif olan hastalarda sırasıyla %18 ve %3.8 oranında HPV tip 16 pozitif bulmuşlardır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (52). Bizim çalışmamızda da ters hibridizasyon prensibiyle çalışan ve L1 gen bölgesini hedef alan LİPA yöntemi kullanılmıştır. 10 hastada (% 5.6) HPV tip 16 pozitif bulunmuştur. 8 hastada (5 ASCUS, 1 HSIL, 2 normal sitolojili) tek başına bulunurken, 2 hastada ise diğer HPV tipleriyle birlikte bulunduğu belirlendi.

İnvaziv servikal kanser prevalansının oldukça yüksek olduğu Afrika'da Castellsague ve ark. (53) normal popülasyondan topladığı 262 servikal örnek ve invaziv servikal kanseri olan hastadan aldığı 241 tümör örneğinde HPV DNA varlığını PCR yöntemiyle araştırmışlardır. Servikal sitolojisi normal olan grupta HPV prevalansı % 75.9 bulunmuş, en sık görülen tipler sırasıyla tip 51 (% 23.6), tip 35 (% 19.6), tip 18 (% 14.2), tip 31 (% 13.5) olarak bildirilmiştir. Servikal kanserli hastaların ise bütün örneklerinde HPV DNA izole edilmiştir. En sık izole edilen tipler tip 16 (% 47), tip 18 (% 31.3) ve tip 51 (% 14.8) olmuştur. Bizim çalışmamızda HPV prevalansı %18.9 bulunmuş, en sık görülen tipler sırasıyla tip 16 (% 20.8) ve tip 51 (% 20.8), tip 6 (% 12.6), tip 53 (% 8.3) ve tip 52 (% 8.3) olmuştur.

Mart 2002- Kasım 2005 tarihleri arasında İzmir'de bir Aile Planlaması Polikliniğine başvuran 1353 kadın ile yapılan bir çalışmada servikal intraepitelyal neoplazi ile HPV enfeksiyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. 1353 hastanın 1344'ünde (%99.3) Pap smear sonucu class 1 veya normal iken, kalan 9 hastada değişik derecelerde servikal intraepitelyal neoplazi (5 CIN 1, 3 CIN 2, 1 karsinoma in situ) saptanmıştır. Hybrid capture 2 (Digene Diagnostics, Silver Spring, MD) ile yapılan HPV DNA araştırmasında 9 olgunun hepsinde sonuç pozitif, diğer grupta ise 20 olguda (% 1.5) HPV DNA pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca cinsel partner sayısı ile HPV pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı

bir ilişki bulunmuş ($p<0.05$), iki veya daha fazla partneri olan kişiler sıklıkla HPV (+) grupta (%6.9) gözlenmiştir (54).

Nielsen ve ark.(55) nin genç ve yaşlı yaklaşık 12.000 katılımcıyla (20-29 yaşları arasında 10.544; 40-50 yaşları arasında 1443 kadın) yaptığı bir çalışmada aşılama programı öncesinde HPV prevalansı ve bununla ilişkili risk faktörleri araştırılmıştır. HPV genotiplemesinin LİPA yöntemiyle yapıldığı çalışmada genç hasta grubunda prevalans % 17.9, yaşlı hasta grubunda ise % 4.4 bulunmuştur. Majör risk faktörünün yaşam boyu cinsel partner sayısı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca birden fazla HPV tipiyle infeksiyonun kazanılmasında partner sayısının, oral kontraseptif kullanımının ve mevcut klamidyal infeksiyonunun risk artışına yol açtığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise partner sayısı ile HPV pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Çalışmamıza dahil edilen hastaların büyük çoğunluğunun tek cinsel partneri (172 hasta/ %95.6) vardı. İki veya daha fazla cinsel partneri olan yalnızca 8 hasta (% 4.4) bulunmaktaydı. Tek partneri olan hastaların % 18'inde (31 hasta) HPV DNA pozitif bulunurken, iki partneri olan 7 hastanın 2'sinde (% 28.6) ve üç partneri olan bir hastada pozitif sonuç elde edilmiştir.

Danimarka'da HPV aşılama programı öncesi 11.617 kadının katılımıyla yapılan bir çalışmada HPV prevalansı araştırılmış ve tip tayini yapılmıştır. Buna göre HPV prevalansı % 26.4 bulunmuş, 20-24 yaşlar arasında HPV prevalansının pik yaptığı (%50.2) ve sonrasında yaşla birlikte prevalansın giderek azaldığı görülmüştür. Aşının hedef kitlesi olan 15-19 yaşlar arasındaki kadınlarda ise % 14 oranında HPV 16/18, % 16 oranında HPV 6/11 bulunmuştur. Elde edilen bu oranlarla HPV 16/18 aşısının önemli derecede koruma sağlayabileceği kanısına varılmıştır (56).

Tuncer ve ark. (57) rutin Pap smear tarama programına katılan seksüel aktif 1032 hastada yüksek riskli HPV oranını % 4 (41 hasta) bulmuşlardır. Bu oranın 30-34 yaşları arasında en yüksek olduğunu (% 5.5) göstermişlerdir. Çalışmamızda HPV'nin yaşa spesifik prevalansı incelendiğinde bu çalışmanın aksine 20-24 yaşları arasında bir pik görülmemiş, ayrıca prevalansın yaşla birlikte arttığı ve 55 yaş ve üstünde en yüksek (% 27.3) olduğu görülmüştür. Çalışmamızda 24 yaş ve altında yalnızca 7 hasta olduğu ve katılımcıların büyük bir kısmı 25-54 yaş arası olduğu için prevalans dağılımında farklılıklar olabileceği, aynı zamanda yaşla birlikte artan HPV maruziyeti ve immün sistemin zayıflaması da bu sonucun nedenleri arasında sayılabileceği kanısına varılmıştır.

Tayvan'da 16-78 yaşları arasında 4383 seksüel aktif kadın hastanın katılımıyla yapılan bir çalışmada alınan servikal örnekler HPV DNA varlığı açısından değerlendirilmiş, HPV

prevalansı % 19.3 olarak bulunmuştur. Yüksek riskli HPV prevalansı ise % 11.1 olup, bu grup içinde en sık görülen tipler HPV tip 16 (% 22.1), tip 52 (% 21.3), tip 58 (% 19.9) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca 30 yaş ve altındaki kadınlarda yüksek riskli HPV prevalansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadaki verilere göre HPV prevalansı tüm dünyadaki verilere benzer olmakla beraber tip 52 ve 58'in prevalansı yapılan diğer birçok çalışmanın aksine yüksek bulunmuştur (58).

Meksika'da HPV prevalansının araştırıldığı bir çalışmada hastalardan alınan servikal sürüntü örneklerinde sitolojik çalışmanın yanısıra PCR ile HPV DNA araştırılmıştır. Ayrıca hastaların yaş, sigara kullanımı, doğum sayısı ile ilgili bilgileri kaydedilmiş, HPV ile bu demografik faktörler arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmaya göre HPV prevalansı % 25.4 olarak bulunmuş, prevalansın 18-24 ve 55-64 yaşlar arasında iki pik yaptığı görülmüştür. İkinci pikin latent virüs infeksiyonunun reaktivasyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür. Katılımcıların büyük bir kısmı (%93.8) sigara kullanmadığından sigara önemli bir risk faktörü olarak bulunmamıştır. Doğum sayısının önemli bir risk faktörü olduğu görülmüş, artan doğum sayısı ile birlikte servikal neoplazinin derecesinin arttığı bildirilmiştir (59). Bizim çalışmamızda doğum sayısı 1 ve altında olan 93 hastanın 16'sında (% 17.2), 2-3 olan 68 hastanın 11'inde (% 16.2), 4 ve üzerinde olan 19 hastanın 7'sinde (% 36.8) HPV DNA pozitif bulunmuştur. Doğum sayısının artmasıyla HPV prevalansının arttığı görülmüş, fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Her yıl yaklaşık 2600 yeni servikal kanser vakasının tanımlandığı Hollanda'da elde edilen istatistik verilerine göre 1970'lerde kanserli hastaların ortalama yaşı 54 iken 1990'larda bu durum 10 yıl öne gelmiştir. Sapy ve ark. Ocak 1997- Aralık 2002 yılları arasında üçüncü basamak bir hastaneye başvuran değişik derecelerde patolojisi pozitif olan 3480 hastada yaşa spesifik HPV prevalansını araştırmışlardır. Bu çalışmada 35 yaş üstündeki hastalarda hem yüksek riskli, hem de düşük riskli HPV prevalansının giderek düştüğü görülmüştür (60).

Servikal kanser hem gelişmiş, hem de gelişmekte olan ülkelerde yüksek bir mortaliteye sahiptir. HPV infeksiyonları servikal kanser gelişmesinde önemli bir risk faktörüdür. 2006 yılında İspanya'da yapılan bir çalışmada HPV'nin genel popülasyondaki prevalansı % 10.7 olarak bulunmuştur (61). Bir başka çalışmada ise İspanya'da bir kolposkopi kliniğine başvuran servikal displazisi olan 496 hastada Line Probe assay (LİPA) ve microarray yöntemleri ile HPV DNA varlığı araştırılmıştır. Hastaların %68'inde (338/496) HPV DNA pozitif bulunmuş, en sık görülen HPV tipi tip 16 (% 27) olarak bulunmuş, bunu sırasıyla

tip 53 (%9.4) ve tip 51 (%8) izlemiştir. İkinci en sık görülmesi beklenen tip 18 ise 17 hastada (%3.4) bulunmuştur. Hastalarda artan sitolojik derece ile HPV arasında olumlu bir ilişki olduğu görülmüştür. Hastaların %24.1'inde (120/496) birden fazla HPV tipiyle enfeksiyon varlığı gözlenmiş, bu gruptaki hastaların tekli enfeksiyonu olanlara göre daha genç yaşta olduğu belirlenmiştir (62). Bizim çalışmamızda da HPV tiplerinin dağılım oranı İspanya'da yapılan çalışmaya benzer bulunmuştur. En sık görülen tipler HPV 16 ve 51 olmuştur ve HPV tip 18 ise yalnızca bir hastada (%0.6) diğer HPV tipleriyle beraber bulunmuştur. Çalışmamızda aynı zamanda birden fazla HPV tipiyle enfekte 8 hasta bulunmaktaydı. Bu hastalar yaş grubu ve smear tipine spesifik bir dağılım göstermemiştir.

HPV enfeksiyonunun bulaşmasında asemptomatik cinsel partner önemli rol oynamaktadır. Hindistan'da Pap testi sonucuna göre servikal sitolojisi normal olan 470 kadın hastadan servikal sürüntü örneği ve 104 erkek hastadan alınan idrar örneğiyle yapılan bir çalışmada asemptomatik popülasyondaki HPV prevalansı belirlenmeye çalışılmıştır. 38 (%8.1) kadın hasta ve 12 (%11.5) erkek hastada pozitif sonuç elde edilmiştir (63). Kadın hastalarla yapılan fazla sayıdaki çalışmaya rağmen erkek hastalarla yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. HPV enfeksiyonları erkek hastalarda genellikle subklinik seyrederek. Asemptomatik taşıyıcılar rezervuar görevi görmekte ve virüs bulaşında potansiyel vektör olabilmektedir. Bu nedenle daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. Böylece HPV aşı çalışmalarına hedef kitle açısından yön verilebilecektir.

Kondiloma aküminata en sık cinsel yolla bulaşan hastalıklardan biridir ve çoğunlukla düşük riskli HPV tipleriyle ilişkilidir. Fransa'da yapılan çok merkezli, prospektif bir çalışmada eksternal kondiloma aküminatası olan hastalarda INNO LİPA yöntemi ile HPV genotipi araştırılmıştır. Çeşitli kliniklere başvuran kondiloma aküminata tanısı almış 256 kadın ve 260 erkek hastadan örnek alınmış, alınan örneklerin 423'ünün örnek kalitesi çalışma için yeterli bulunmuştur. Çalışmaya alınan hastaların HPV DNA prevalansı %99 olarak bulunmuş, düşük riskli HPV tiplerinin çoğunlukta (%89) olduğu belirtilmiştir. Buna göre en sık görülen HPV tipleri sırasıyla tip 6 (%69) ve tip 11 (%16) iken bunu yüksek riskli tiplerden olan tip 16 (%9), tip 51 (%8) ve tip 52 (%7) izlemiştir. Tip 6, 11, 16, 18'in toplam prevalansının % 88 olduğu bu çalışmaya göre quadrivalan HPV aşısının muhtemelen % 62-87 koruma sağlayacağı düşünülmektedir (64). Bizim çalışmamızda da kondilomu olan 6 hastanın lezyonlarından alınan sürüntü örneğinde HPV DNA varlığı araştırılmış. İki hastada pozitif sonuç elde edilmiştir. Bir hastada HPV 11 izole edilirken, diğerinde HPV 6, yüksek riskli tip olan HPV 16 ile birlikte bulunmuştur.

HPV infeksiyonlarının kazanılmasında genç yaş ve artan cinsel partner sayısı major risk faktörleri olsa da diğer cinsel yolla bulaşan infeksiyonlar, sigara, immünsupresyon, oral kontraseptif kullanımı da diğer risk faktörleri arasındadır. Östrojen antikör yanıtını ve hücrel immün sistemi uyardığı için infeksiyonların erken evresinde önemli bir rol oynamaktadır. Hormon terapisinin HPV ilişkili servikal lezyonların insidansına etkisi ile ilgili veriler değişmektedir (65). Amerika’da 444 üniversite öğrencisiyle yapılan bir çalışmada oral kontraseptif kullanan ve kullanmayan öğrencilerin 4 ayda bir kontrolleri yapılmış ve çalışma sonucunda (toplam kontrol süresi ortalaması 41.2 ay) oral kontraseptif kullanımı ile HPV infeksiyonları arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmiştir (66).

Moreno ve ark.(67) invaziv servikal kanserli hastalarla yapılan 8 vaka kontrol çalışmasının ve karsinoma in situ olan hastalarla yapılan iki çalışmanın verilerini incelemişler ve hastaların oral kontraseptif kullanımı ile ilgili kişisel bilgilerini elde etmişlerdir. Elde edilen verilere göre servikal kanseri olan 1561 hastanın 1465’i (% 94), karsinoma in situ olan 292 hastanın 211’i (%72) HPV DNA açısından pozitif bulunmuştur. Hiç oral kontraseptif kullanmamış hastalar ile 5 yıldan az kullanmış olan hastalar karşılaştırıldığında servikal kanserde bir risk artışı bulunmamıştır. Buna rağmen 5-9 yıl yada 10 yıldan daha uzun süre oral kontraseptif kullanan hastalarda ise kanser riskinde 3 katlık bir artış olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamıza katılan hastalardan oral kontraseptif kullanımı ile ilgili bilgileri alınmış fakat toplam kullanım süresi ilgili net veriler elde edilememiş ve aynı zamanda uzun süreli hasta takibi yapılmamıştır. Bu nedenle oral kontraseptif kullanımının kümülatif etkisi araştırılmamıştır. Çalışmaya alınan 180 hastanın yalnızca 11’i oral kontraseptif kullandığını bildirmiştir. Bunların da 2 tanesinde (%18.2) HPV DNA pozitifliği elde edilmiştir. Oral kontraseptif kullanmayan hastaların ise %18.9’unda pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre oral kontraseptif kullanımı ile HPV arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Onkojenik HPV tipleri ile infeksiyonun servikal kanser gelişiminde önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Bununla beraber HPV infeksiyonundan servikal kansere progresyonda eksojen ve endojen başka kofaktörlere gereksinim duyulmaktadır. Yapılan birçok vaka kontrol çalışmasında sigara kullanımı ile servikal kanser arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (68). Sigaranın servikal doku üzerinde mutajenik etkileri olmakta ve serviksin hücrel immün yanıtının major komponenti olan Langerhans hücrelerinde azalmaya neden olmaktadır. ABD’de Giuliano ve ark. 18-35 yaşları arasında 346 kadın hastada sigaranın onkojenik HPV infeksiyonlarının vücuttan eradikasyonundaki

etkisini araştırmışlardır. Hastalarda HPV DNA varlığı Hybrid Capture 2 ve PCR yöntemleriyle araştırılmış. Hastaların muayene sırasında sigara maruziyeti olup olmadığı, varsa bunun miktarı ve ilk maruziyet yaşı gibi bilgileri elde edilmiştir. Yapılan alışma sonucunda sürekli sigara kullanan hastalarda hiç sigara içmemiş hastalara kıyasla onkojenik HPV infeksiyonlarının vücuttan uzaklaştırılması ihtimalinin daha düşük olduğu bildirilmiş; HPV infeksiyonlarının eradikasyonu ile sigara kullanım süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (69).

Rusya'da servikal skuamöz intraepitelyal lezyonu olan 30 yaş üstündeki sitoloji sonucu normal olan 742 hasta, ASCUS olan 59 hasta, LSIL olan 21 hasta ve HSIL olan 1 hastada yüksek riskli HPV prevalansı araştırılmıştır. Yüksek riskli HPV prevalansı sırasıyla %10, %18.6, %100 ve %100 olarak bulunmuştur. Hastaların bazı demografik özellikleri incelendiğinde ilk cinsel ilişki yaşı 18'in altında olan hastalarda HPV prevalansı % 17.3 iken, 18'in üstünde olan hastalarda % 12.1 bulunmuştur. Hiç sigara içmemiş hastalarda ise prevalans % 11.1, daha önce sigara içmiş olanlarda % 14.1, halen içmekte olan hastalarda ise % 16.3'tür (70). Bizim alışmamızda 28 hasta (%15.6) sigara kullanmakta idi. Bunların %25'inde HPV DNA pozitif bulunmuştur. Sigara kullanmayan 152 olgunun ise % 17.8'inde HPV DNA pozitifliği elde edilmiştir. Seksüel aktif genç kadınlarda genital HPV infeksiyonu prevalansı yüksektir. Çalışmamızda elde edilen bulgular da bu durumu desteklemektedir. İlk cinsel ilişki yaşı 15 ve altında olan hastalarda HPV prevalansı % 60 iken, 20 yaş ve üstünde olanlarda % 14.5'e düşmektedir.

in'de Li ve ark. (71) yüksek derecede servikal prekanseröz lezyonu ve servikal kanseri olan hastalarda HPV prevalansını araştırmış ve genotiplerini tanımlamışlardır. Servikal kanseri olan 144 hasta ve HSIL olan 63 hasta HPV varlığı açısından araştırılmış ve HPV prevalansı sırasıyla %80.6 ve % 61.9 olarak bulunmuştur. En sık görülen tip HPV 16 (kanserli hastalarda %68.1; HSIL olan hastalarda % 34.9), ikinci en sık görülen tip HPV 58 (kanserli hastalarda %8.3; HSIL olan hastalarda %17.5) olarak bildirilmiştir. nc en sık görülen tip olan HPV tip 18 ise sıklıkla adenokanseri olan hastalardan izole edilmiştir (adenokanser % 21.4; skuamöz hücreli kanser %3.1).

HPV infeksiyonlarının seyri sırasında oluşan düşük dereceli servikal intraepitelyal lezyonlar (LSIL) konak immün sistemi tarafından gerileyebileceği gibi yüksek dereceli lezyonlara da ilerleyebilir. Fransa'da Pretet ve ark. LSIL tanısı almış 397 hastanın smear örneklerinde INNO-LİPA yöntemi ile HPV DNA varlığını araştırmışlar ve olguların %98'inde sonuç pozitif olarak bulunmuştur. En sık görülen tipler sırasıyla tip 66 (% 25), tip 16 (% 21), tip 53 (% 18) olarak bildirilmiştir. Bivalan aşının içinde bulunan tip 16 ve

18 %28 oranında görülürken, quadrivalan aşının içinde bulunan tip 6, 11, 16 ve 18 ise %33 oranında görülmüştür (72). Pretet ve ark. nın yaptığı benzer başka bir çalışmada da HSIL olan 493 servikal örnek HPV DNA varlığı açısından araştırılmış, HPV prevalansı % 98 olarak bulunmuştur. En sık tespit edilen tip % 62 oranla tip 16 olup, bunu tip 31 (% 15), tip 33 (% 12), tip 52 (%9) ve tip 51 (% 8) izlemiştir (73). Pretet ve ark. düşük dereceli lezyonlarda yüksek oranda görülen muhtemel yüksek riskli gruptaki tip 66 ve tip 53'ün yüksek dereceli lezyonlarda azalan oranlarda görülmesi sonucu bu gruptaki HPV tiplerinin lezyonların kansere progresyonunda daha az rol aldığını göstermişlerdir. Ayrıca yüksek dereceli lezyonlarda HPV tip 31 ve tip 33'ün prevalansının yüksek olması, bu tiplerle infekte lezyonların kansere ilerlemesinde riskin yüksek olduğunu düşündürmektedir. Bizim çalışmamıza LSIL ve HSIL olan 2'şer hasta dahil edilmiştir. Çalışmamıza alınan sınırlı sayıdaki hasta sayısına rağmen HSIL olan bir hastada tip 16, diğer hastada tip 33 bulunmuştur. LSIL olan iki hastanın birinde ise tip 51 tespit edilmiş, diğerinde ise pozitif sonuç elde edilememiştir.

Ekim 1998- Haziran 2000 tarihleri arasında İspanya Barselona'da rastgele seçilen 973 kadının servikal smear örnekleri HPV DNA araştırmak üzere alınmıştır. Yapılan çalışma sonunda HPV prevalansı % 3 olarak bulunmuştur. Yaşa spesifik prevalansı incelendiğinde prevalansın 25 yaş altında en yüksek olduğu yaş arttıkça prevalansın azaldığı görülmüştür. Bununla beraber 65 yaş üstünde prevalansın tekrar artış gösterdiği görülmüştür. Boşanmış kadınlarda evli kadınlara oranla, iki yada daha fazla cinsel partneri olanlarda tek eşlilere oranla HPV prevalansının daha yüksek olduğu, ayrıca ilk cinsel ilişki yaşı 18 yaş ve altında olan kadınlarda HPV prevalansında artış olduğu fakat bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada düzenli partnerle kondom kullanımının koruyucu olduğu bildirilmiştir (74).

Ülkemizde Öztürk ve ark.nın (75) yaptığı benzer bir çalışmada 18-62 yaş arası 200 hasta rastgele olarak seçilmiş ve hybrid capture yöntemiyle HPV DNA varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada % 4.9 oranında HPV DNA pozitif bulunmuş, daha genç popülasyonda HPV DNA pozitifliğinin daha fazla olduğu (30-39 yaş grubunda % 7.3) gösterilmiştir. İlk cinsel ilişki yaşı erken olan hastalarda (15-19 yaş grubu) % 6.3 oranında, oral kontraseptif kullanan hastalarda % 7.7 pozitiflik saptanmıştır. Servikal sitolojisi normal olan hastalarda % 2.1 oranında pozitiflik saptanırken, epitelyal hücre anormalliği olanlarda bu oran % 42.9'a yükselmiştir.

2005-2006 yıllarında Amerika'daki yaşlı kadınlarda HPV prevalansının araştırıldığı bir çalışmaya 57-85 yaşları arasındaki 1550 hasta dahil edilmiştir. Hastaların kendi vajinal

örneklerini aldıkları çalışmada 1010 örnek çalışma için uygun bulunmuştur. Yapılan çalışmada yüksek riskli HPV prevalansı % 6 bulunmuş ve bunların % 63 'ünde birden fazla HPV tipiyle infeksiyon olduğu görülmüştür. Ayrıca hastaların bazı demografik özellikleri incelendiğinde evli olmayan kadınlarda ve sigara içenlerde yüksek riskli HPV prevalansının artmış olduğu görülmüştür (76). Bizim çalışmamızda birden fazla HPV tipiyle infekte 8 hasta bulunmaktaydı ve tamamı 30 yaşın üstündeydi. Daha ileri yaşlarda birden fazla HPV tipiyle olan infeksiyon oranının genç hastalara oranla oldukça yüksek olması dikkat çekicidir. Hayat boyu toplam maruziyetin fazla olması, viral infeksiyonun reaktivasyonu yada yaşlılığa bağlı yeni infeksiyonun temizlenme veya latent virüs infeksiyonunun baskılanma kapasitesinde yetersizlik bu durumu açıklayabilir.

Brezilya, Kanada ve Amerika'da yapılan çok merkezli bir çalışmada 15-25 yaşları arasında 3204 sağlıklı kadından alınan servikal örneklerde SPF₁₀- LIPA₂₅ ile HPV DNA araştırılmıştır. Onkojenik HPV prevalansı Brezilya'da %25, Kanada'da %16.9, Amerika'da %19.1 bulunmuştur. HPV 16 en sık görülen tip olmuştur (% 5.2). Birden fazla HPV tipiyle infeksiyon infekte hastaların üçte birinde görülmüştür (77).

Kahn ve ark.nın Amerika'da yaptığı başka bir çalışmada yüksek riskli HPV infeksiyonu ile sosyodemografik faktörler arasındaki ilişki incelenmiştir. Bir sağlık merkezine başvuran 14-59 yaşları arasındaki 1921 katılımcıyla yapılan çalışmada HPV prevalansı % 26.8, yüksek riskli HPV prevalansı % 15.6 bulunmuştur. Bu çalışmada 14-17 yaşları arasındaki kızlarda %13 oranında HPV pozitifliği elde edilmiş, buna göre aşının daha etkin olabilmesi için HPV maruziyetinden önce uygulanması, hedef grubunun 11-12 yaşlarındaki kızlar olması gerektiği belirtilmiştir. Ekonomik durumu kötü olan ve eğitim seviyesi düşük olanlarda HPV prevalansının daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Ayrıca evli kadınlarda evli olmayanlara oranla HPV infeksiyon oranı daha düşük elde edilmiştir (78). Bizim çalışmamızda da Kahn ve ark. yaptığı çalışmaya benzer olarak dul veya bekar olmanın HPV infeksiyonu açısından yüksek risk taşıdığı gösterilmiştir.

İtalya'da bir çalışmada göçmen kadınlardaki HPV prevalansı ve bunun sosyodemografik özelliklerle ilişkisi incelenmiştir. 60'ı (% 52.2) Afrika'dan; 55'i (% 47.8) Doğu Avrupa'dan gelen 115 kadının dahil edildiği çalışmada 55 (% 47.8) hastada HPV DNA izole edilmiştir. Toplamda en sık görülen tip HPV 16 olmuştur, bunu tip 18 ve 51 izlemiştir. Tip 56 sadece Afrika göçmenlerinden izole edilirken (% 3.3), tip 39 ise Doğu Avrupa göçmenlerinde tespit edilmiştir (% 7.3). Bekar olmanın ve artan doğum sayısının HPV infeksiyonlarında önemli belirleyiciler olduğu belirtilmiştir (79).

HPV infeksiyonunun bulaşmasında kondom kullanımının koruyucu olup olmadığını değerlendirmek amacıyla Winer ve ark. 82 üniversite öğrencisini yaklaşık 34 aylık bir periyotta her dört ayda bir Pap smear ve HPV DNA testi yaparak gözlemlemiştir. Yapılan çalışmaya göre kondom kullanımının yeni cinsel aktif kadınlarda servikal ve vulvovajinal HPV infeksiyonu riskini azalttığı gösterilmiştir (80).

Meksika'da 237 kadın üniversite öğrencisiyle yapılan bir çalışmada sürekli kondom kullanmayan ve birden fazla cinsel partneri olanlarda yüksek riskli HPV prevalansında 3.8 katlık bir artış olduğu bildirilmiştir (81). Çalışmamıza dahil edilen hastaların büyük bir kısmı kondom dışı kontrasepsiyon yöntemi kullanmaktaydı (%83.3). Bununla birlikte kondom kullanılan grupta HPV prevalansı %6.7, kullanılmayan grupta ise %21.3 bulunmuştur.

Servikal kanser insidansının oldukça yüksek olduğu Latin Amerika ve Karayipler'de Almonte ve ark. (82) HPV infeksiyonları ile ilişkili risk faktörleri ve bu infeksiyonların servikal kansere progresyonundaki kofaktörleri araştırmıştır. Çalışma sırasında üç farklı kaynaktan (Dünya Sağlık Örgütü istatistikleri, bölgenin sosyodemografik haritası ve burada yapılan epidemiyolojik çalışmalar) elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Sonuçta yaşam boyu cinsel partner sayısı ve erkek partnerin cinsel davranışının HPV infeksiyonunda risk artışına yol açtığı gözlenmiştir. Bununla beraber doğum sayısı, uzun süre oral kontraseptif kullanımı ve sigara kullanımının da HPV infeksiyonlarının servikal kansere ilerlemesinde önemli kofaktörler olduğu belirtilmiştir.

Türkiye'de ve çeşitli ülkelerdeki, HPV prevalans çalışmaları ve oranları tablo XIV'de gösterilmiştir. Belirtilen çalışmalarda HPV prevalansında farklılıklar görülmüştür. Katılımcıların yaş aralığının ve smear özelliklerinin farklı olması, çalışılan farklı duyarlılıktaki testler, ülkelerdeki coğrafi-kültürel özellikler, ayrıca gelişmiş ülkelerdeki sistematik tarama programlarının ve HPV aşılarının etkinliği HPV prevalans değerlerindeki farklılıkların sebepleri arasında sayılabilir.

HPV infeksiyonu ve ilişkili risk faktörlerini değerlendiren çalışmalar da tablo XV'de gösterilmiştir.

Tablo XIV: Yıl ve bölgelere göre HPV prevalansı

Araştırmacılar	Yıl	Yer	Örnek sayısı ve tipi	HPV prevalansı (%)
Dursun ve ark. (50)	2004-2008	Ankara	403 (310 normal sitoloji, 93 anormal smear)	23
Yavuzer ve ark. (51)	2009	İstanbul	50 serviks ca ve CIN	70
Dinç ve ark. (52)	2003-2004	Ankara	102 (50 kolposkopi negatif, 52 pozitif)	sırasıyla 3.8, 18
İnal ve ark. (54)	2002-2005	İzmir	1353 (1344 normal, 9 CIN)	sırasıyla 1.5, 100
Kjaer ve ark. (56)	2004-2005	Danimarka	11617 normal popülasyon	26.4
Marquez ve ark. (59)	2006-2007	Meksika	326 normal popülasyon	25.4
Cobo ve ark. (61)	2006	İspanya	Normal popülasyon	10.7
Kerkar ve ark. (63)	2011	Hindistan	470 normal smear	8.1
Lin ve ark. (58)	2003-2004	Tayvan	4383 normal popülasyon	19.3
Sanjose ve ark. (74)	1998-2000	İspanya	973 normal popülasyon	3
Öztürk ve ark. (75)	2004	Denizli	200 normal popülasyon	4.9
Kahn ve ark. (78)	2003-2004	Amerika	1921 normal popülasyon	26.8
Bizim çalışmamız	Mayıs 2010-2011	Konya	92 normal popülasyon, 71 ASCUS, 4 AGUS, 3 ASC-H, 2 LSIL, 2 HSIL	Sırasıyla 16.3, 16.9, 25, 33.3, 50, 100

Tablo XV: HPV infeksiyonu ve ilişkili risk faktörlerinin farklı çalışmalarda değerlendirilmesi

Yapılan Çalışmalar	RİSK FAKTÖRLERİ							
	Yaşa spesifik prevalans	Partner sayısı	İlk cinsel ilişki yaşı	Medeni durum	Doğum sayısı	Sigara kullanımı	OKS kullanımı	Kondom kullanımı
Mohllajee ve ark (66)							Risk ↑	
Giuliano ve ark.(69)						Risk ↑		
Sanjose ve ark.(74)	25 yaş altı ve 65 yaş üstü↑	Risk ↑	18 yaş ve altı Risk ↑	Boşanmış Risk ↑				Risk ↓
Lindau ve ark. (76)				Evli olmayan Risk ↑		Risk ↑		
Giovannel li ve ark.(79)				Evli olmayan Risk ↑	Risk ↑			
Sanchez-Aleman ve ark.(81)		Risk ↑						Risk ↓
Almonte ve ark.(82)		Risk ↑			Risk ↑	Risk ↑	Risk ↑	
Bizim çalışmamız			19 yaş ve altı Risk ↑	Evli olmayan Risk ↑				

Sonuç olarak ;

- 1.Human Papillomavirus infeksiyonları oldukça yaygın olup, genellikle asemptomatik seyrederek.
- 2.Kültürü yapılamayan ve serolojik testlerin anlamlı olmadığı bu virüsün tansında moleküler yöntemler en geçerli yaklaşımdır.
- 3.Çalışmamızda Kadın Doğum Polikliniklerine başvuran 180 hastada HPV prevalansı, tipleri ve bunların demografik faktörlerle ilişkisi irdelenmiştir.
- 4.HPV prevalansı toplamda %18.9 bulunmuş, en sık görülen tiplerin sırasıyla tip 16 (%20.8), 51 (%20.8), 6 (%12.6), 53(%8.3) ve 52(%8.3) olduğu tespit edilmiştir.

5.HPV pozitiflik oranı ile hastaların medeni durumu ve ilk cinsel ilişki yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmiş; buna göre dul veya bekar olanların, evli olanlara göre ve ayrıca ilk cinsel ilişki yaşı 19 yaş ve altında olanların, 20 yaş ve üstünde olanlara göre daha fazla risk taşıdığı görülmüştür. Kondom kullanan hastalarda da HPV DNA pozitifliğinin kullanmayanlara oranla daha düşük olduğu görülmüş, fakat sonuçlar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

6. Hastalardan alınan smear örneklerinde ayrıca sitolojik inceleme yapılmış, artan sitolojik derece ile HPV DNA pozitiflik oranının arttığı görülmüştür.

7.Çalışmamız Konya bölgesi ve çevresinde HPV prevalansı ve tip dağılımı ile ilgili ön verileri ortaya koymakta ve ülkemizdeki HPV infeksiyonlarının epidemiyolojisinin aydınlatılmasına katkıda bulunmaktadır. Böylece bölgesel yüksek riskli HPV tiplerinin dağılımının ortaya çıkarılması mümkün olacak ve bu bilgilerin aşı çalışmalarında kullanılması faydalı olacaktır.

6. ÖZET

Amaç: Konya bölgesinde HPV prevalansı, tipleri ve bunların bazı demografik faktörlerle ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza Mayıs 2010–2011 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi ve Konya Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi Kadın Doğum Polikliniklerine başvuran 21-81 yaşları arasındaki cinsel yönden aktif 180 hasta dahil edildi. Hastalardan rutin jinekolojik muayene sırasında Pap smear ve HPV DNA testi için servikal sürüntü örneği alındı. Pap smear testi için örnekler Papanicolaou boyası ile boyanıp Bethesda 2001 terminoloji sistemi esas alınarak değerlendirildi. HPV DNA saptanması için Stuart's taşıyıcı besiyerine (Copan, İtalya) alınan sürüntü örnekleri Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışma yapılincaya kadar -20 °C'de saklandı. High Pure Viral Nucleic Acid kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ile DNA izolasyonu yapıldı. INNO-LİPA HPV Genotyping Extra Amp (INNOGENETICS N. V., Belçika) kiti ile amplifikasyon yapıldı. PCR ampikonları nitrosellöz banttaki yakalayıcı spesifik oligonükleotid proplara hibridize edildikten sonra INNO-LİPA HPV Genotyping Extra Okuma Kartı yardımıyla sonuçlar değerlendirildi.

Bulgular: Hastaların % 18,9'unda (n=34) HPV DNA pozitif bulundu. En sık görülen tipler sırasıyla tip 16 (%20.8) ve tip 51 (%20.8), tip 6 (%12.6), tip 53 (%8.3) ve tip 52 (%8.3) olmuştur. Hastaların medeni durumu ve ilk cinsel ilişki yaşı ile HPV DNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (p<0.05). Smear sonuçlarının dağılımı ise şu şekildeydi; 92 hasta (%51,1) normal, 71 hasta (% 39,4) ASCUS, 4 hasta (% 2,2) AGUS, 3 hasta (% 1,7) ASC-H, 2 hasta (1,1) LSIL, 2 hasta (% 1,1) HSIL idi. Artan smear derecesi ile HPV DNA pozitiflik oranının arttığı görüldü.

Sonuç: Servikal neoplazilerle yakından ilişkili olan HPV infeksiyonlarının tanısında PCR yöntemleri hızlı, kolay ve güvenilir yöntemlerdir. Bu açıdan risk taşıyan kişilerin belirlenmesi ve uygun klinik yaklaşımın belirlenebilmesi için HPV tanı testleri Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda rutin olarak kullanılmalıdır. HPV prevalansı ve tiplerinin dağılımını belirleyen bölgesel çalışmalar yapılacak aşı çalışmalarına katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: *Human Papillomavirus, PCR, Pap smear testi, DNA.*

7. ABSTRACT

Objective: It was aimed to determine the prevalence of HPV, type distribution in Konya region and to investigate the relationship between these results and sociodemographic factors.

Materials And Methods: Between May 2010-2011 sexual active in 21-81 age groups 180 patients applying to Obstetrics and Gynecology Clinics of Selcuk University Meram Medical Faculty Hospital and Konya Dr. Faruk Sükan Child and Woman Hospital were included in this study. Cervical swap samples were collected for Pap smear and HPV DNA test during routine gynecological examination. For Pap test, these samples were stained with Papanicolaou and cytological examination were performed according to the Bethesda 2001 classification. Cervical samples were obtained with Stuart's transport medium (Copan, Italy) and stored at -20°C in deepfreeze in Microbiology Department until molecular test of HPV DNA was carried out. DNA isolation were performed with High Pure Viral Nucleic Acid (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and amplification with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp (INNOGENETICS N. V., Belgium) kit. PCR amplicons were hybridized with specific oligonucleotide probes and the results were evaluated by using the INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Reading Card.

Results: HPV DNA was detected in % 18,9 (n=34) of cases. The most frequent genotypes were HPV 16 (%20.8), HPV 51 (%20.8), HPV 6 (%12.6), HPV 53 (%8.3) and HPV 52 (%8.3). The marital status and age at the first sexual intercourse of patients were found to be statistically significant with HPV DNA positivity (p<0.05). According to cytologic category 71 (% 39.4) patients had ASCUS, 4 (% 2.2) had AGUS, 3 (% 1.7) had ASC-H, 2 (% 1.1) had LSIL and 2 (% 1.1) had HSIL. 92 (% 51.1) patients were with normal cytology. We observed that the prevalence of HPV DNA was increased according to the severity of the cytologic category.

Conclusion: PCR assays were found to be rapid, easy and reliable methods and, used in the diagnosis HPV infections closely related with cervical neoplasia. These tests should take place among the routine diagnostic procedures at clinical microbiology laboratories to detect risk group and to appropriate clinical approach. The studies that determine HPV prevalence and type distribution in our region might contribute the vaccine trials.

Key words: : *Human Papillomavirus, PCR, Pap smear test, DNA.*

8.TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım tez çalışmamda ve her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Bülent BAYSAL'a, Sayın Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahadır Feyzioğlu'na teşekkür ediyorum. Ayrıca meslek hayatıma katkılarından dolayı hocalarım; Sayın Prof. Dr. İnci TUNCER'e, Sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK'a, tezimi 10102006 no'lu proje ile destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline, hayatım boyunca hep yanımda olan ve benden desteğini, sabrını ve anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme ve eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

9.KAYNAKLAR

- 1.Syrjanen S, Syrjanen K. The history of Papillomavirus research. *Cent Eur J Public Health* 2008; 16:7-41.
- 2.Orth G. Papillomaviruses – Human (Papovaviridae). In: Webster RG, Granof A. *Encyclopedia of Virology*. New York: Academic Press, 2nd ed 1999:1105-1114.
- 3.Boulet G, Horvath C, Broeck DV, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2007;39:2006-2011.
- 4.Lowy D. History of Papillomavirus research. In: Garcea RL, DiMaio D. *The Papillomaviruses*, New York: Springer, 2007; Chapter 2: 13-28.
5. Tuncer S. İnsan Papillomavirusları. In: Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999:797-802
- 6.Ranst M, Kaplan J, Burk R. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *Journal of General Virology* 1992;73:2653-2660.
- 7.Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology* 2005;32:1-6.
- 8.Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
9. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Doorslaer K, Hausen H, Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010;401:70-79.
- 10.Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology* 2010;117:5-10.
- 11.Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of Human Papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 2008;107(3):198-217.
12. Wang KL. Human Papillomavirus and vaccination in cervical cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007;46(4):352-362.
- 13.Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: Insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004; 109:157-162.
- 14.Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of Human Papillomaviruses. *J Dent Res* 2009;88(4):307-317.
15. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004; 68:362-372.
- 16.Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS* 2010;118:422-449.
- 17.Patterson BK. Human Papillomaviruses. In:Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM , 9th Ed 2007:1601-1611.
- 18.Stanley M. HPV genital tract infection: molecular pathogenesis. *CME Journal of Gynecologic Oncology* 2009;14:30-35.
- 19.LaCour DE, Trimble C. Human Papillomavirus in infants: transmission, prevalence and persistence. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2011:1-5.
- 20.Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen- Camacho ME, Garcia-Cuellar CM, Guido-Jimenez M, Mendez-Martinez R, et al. High association of Human Papillomavirus infection with oral cancer. *Archives of Medical Research* 2008;39:189-197.
- 21.Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology* 2005;32:59-66.
- 22.Gillison ML. Human Papillomavirus- related diseases: Oropharynx cancers and potential implications for adolescent HPV vaccination. *Journal of Adolescent Health* 2008;43:52-60.
- 23.Ağaçfidan A, Erturan Z. Human Papillomaviruslar. XXXIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı, Bodrum, 21-25 Ekim 2008: 313-337.
- 24.Corbalan-Velez R, Ruiz-Macia JA, Brufau C, Carapeto FJ. Cutaneous squamous cell carcinoma and human papillomavirus. *Actas Dermosifiliogr* 2007;98:583-593.
- 25.Monk BJ, Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. *Gynecologic Oncology* 2007;107:6-13.

26. Feng Q, Cherne S, Winer RL, Balasubramanian A, Lee SK, Hawes SE, et al. Development and evaluation of a liquid based microarray assay for genotyping genital Human Papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 2009;47(3):547-553.
27. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infections. *Vaccine* 2006;24:4-15.
28. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology* 2005;32:16-24.
29. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007; 297:813-819.
30. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001;164(7):1017-25.
31. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Cancer* 2007;7:11-22.
32. Ault KA. Epidemiology and natural history of Human Papillomavirus infections in the female genital tract. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2006:1-5.
33. Sanclémente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *JEADV* 2002;16:231-240.
34. Campo MS, Roden RBS. Papillomavirus prophylactic vaccines: Established successes, new approaches. *Journal of Virology* 2010;84(3):1214-1220.
35. Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology* 2008;39:154-166.
36. Tristram A, Fiander A. Human papillomavirus (including vaccines). *Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine* 2007;17(11):324-329.
37. Stanley M, Gissmann L, Nardelli-Haeffliger D. Immunobiology of Human Papillomavirus infection and vaccination – implications for second generation vaccines. *Vaccine* 2008;26:62-67.
38. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006;24(1):16-22.
39. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370:890-907.
40. Doymaz MZ. Papovaviridae. In: *Medikal viroloji, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000:294-302.*
41. Molijn A, Kleter B, Quint W, Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology* 2005;32:43-51.
42. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H. Human Papillomavirus. In: *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, Ankara: Güneş kitabevi, 2006:208-109.*
43. Lacey CJN. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *Journal of Clinical Virology* 2005;32:82-90.
44. Sankaranarayanan R. HPV vaccination: the promise and problems. *Indian J Med Res* 2009;130:322-326.
45. Rota S, Biri A, Bozdayı G, Dinç B, Güner H. Farklı hasta gruplarında servikal biyopsi ve sürüntü örneklerinde PCR ile genital Human Papillomavirus araştırılması ve tip tayini. *Türk Mikrobiol Cem Derg* 2004;34:185-189.
46. http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-13438/saglik_istatistikleri_yilligi_2010.pdf (son erişim tarihi 17.8.2011)
47. <http://globocan.iarc.fr> (son erişim tarihi 17.8.2011)
48. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Fırat P, Tuncer ZS, Tuncer S, Ustaçelebi Ş. Sitolojik olarak anomali saptanan serviks örneklerinde insan papillomavirus DNA'sının araştırılması ve virusun tiplendirilmesi. *Mikrobiol Bult* 2007;41: 219-226.
49. Akhan SE. Ülkemizde servikal kanser epidemiyolojisi ve HPV serotipleri. *ANKEM Derg* 2007;21(2):96-98.
50. Dursun P, Senger SS, Arslan H, Kuşçu E, Ayhan A. Human papillomavirus prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infectious Diseases* 2009;9(191):1-6.

51. Yavuzer D, Karadayı N, Erdağı A, Salepçi T, Baloğlu H, Dabak R. Serviks kanseri ve prekanseröz lezyonlarında PCR ile HPV tiplemesi. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi* 2009;(1):1-6.
52. Dinc B, Rota S, Onan A, Bozdayı G, Taskiran C, Biri A, et al. Prevalance of human papillomavirus (HPV) and HPV-16 genotyping by real-time PCR in patients with cervical pathologies. *Braz J Infect Dis* 2010;14(1):19-23.
53. Castellsague X, Klaustermeler J, Carrilho C, Albero G, Sacarial J, Quint W. Vaccine related HPV genotypes in women with and without cervical cancer in Mozambique: Burden and potential for prevention. *Int J Cancer* 2008;122:1901-1904.
54. İnal MM, Köse Ş, Yıldırım Y, Özdemir Y, Töz E, Ertopçu K, ve ark. The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:1266-1270.
55. Ann N, Susanne Krüger K, Christian M, Thomas I. Type-specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12.000 younger and older Danish women. *Sexually Transmitted Diseases* 2008;35(3):276-282.
56. Kjaer SK, Breugelmans G, Munk C, Junge J, Watson M, Iftner T. Population- based prevalence , type- and age-spesific distribution of HPV in women before introduction of an HPV- vaccination program in Denmark. *Int J Cancer* 2008;123:1864-1870.
57. Tuncer ZS, Başaran M, Ustaçelebi Ş, Mocan-Kuzey G. High risk human papillomavirus infection (HPV) determined by hybrid capture II assay in a Turkish university hospital outpatient clinic. *Gynecol Obstet Reprod Med* 2006;12:129-134.
58. Lin H, Ma YY, Moh JS, Ou YC, Shen SY, Chang Chien CC. High prevalence of genital human papillomavirus type 52 and 58 infection in women attending gynecologic practitioners in South Taiwan. *Gynecologic Oncology* 2006;101:40-45
59. Velazquez-Marquez N, Paredes-Tello MA, Perez-Terron H, Santos-Lopez G, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. Prevalance of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla, Mexico. *International Journal of Infectious Diseases* 2009;13:690-695.
60. Sapy T, Poka R, Szarka K, Konya J, Huga S, Hernadi Z. Age-spesifik prevalence of high-risk human papillomavirus infection in a Hungarian female population with positive cytology. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2008;138:194-198.
61. Cobo F, Concha A, Ortiz M. Human Papillomavirus (HPV) type distribution in females with abnormal cervical cytology. *The Open Virology Journal* 2009;3:66.
62. Selva L, Gonzalez-Bosquet E, Rodriquez-Plata MT, Esteva C, Sufiol M, Munoz-Almagro C. Detection of human papillomavirus infection in women attending a colposcopy clinic. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2009;64(4):416-421.
63. Kerkar SC, Latta S, Salvi V, Mania-Paramanik J. Human Papillomavirus infection in asymptomatic population. *Sexual and reproductive healthcare* 2011;2:7-11.
64. Aubin F, Pretet JI, Jacquard AC, Saunier M, Carcopino X, Jaroud F, et al. Human Papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: A large French national study (EDITH IV). *Clinical Infectious Diseases* 2008;47:610-615.
65. Frega A, Scardamaglia P, Piazze J, Cerekja A, Pacchiarotti A, Verrico M, et al. Oral contraceptives and clinical recurrence of human papillomavirus lesions and cervical intraepithelial neoplasia following treatment. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2008;100:175-178.
66. Mohllajee AP, Curtis KM, Martins SL, Peterson HB. Hormonal contraceptive use and risk of sexually transmitted infections. *Contraception* 2006;73:154-165.
67. Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV, Wallboomers JMM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection. *Lancet* 2002;359:1085-1192.
68. Castellsague X, Munoz N. Cofactors in Human Papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2003;31:20-28.
69. Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, Harris R, Baldwin S, Papenfuss MR, et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer causes and Control* 2002;13:839-846.

70. Shipitsyna E, Zolotoverkhaya E, Kuevda D, Nasonova V, Romanyuk T, Khachatryan A, et al. Prevalance of high-risk Human Papillomavirus types and cervical squamous intraepithelial lesions in women over 30 years of age in St. Petersburg, Russia. *Cancer Epidemiology* 2001;35:160-164.
71. Li J, Zhang D, Zhang Y, Wang X, Lin Y, Hu L. Prevalance and genotype distribution of Human Papillomavirus in women with cervical cancer or high-grade precancerous lesions in, Chengdu, western China. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2011;112:131-134.
72. Pretet JL, Jacquard AC, Saunier M, Clavel C, Daches R, Gondry J, et al. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade squamous intraepithelial lesions in France and comparison with CIN2/3 and invasive cancer. *Gynecologic Oncology* 2008;110:179-184.
73. Pretet JL, Jacquard AC, Corcopino X, Monier-Benoit S, Averous G, Soubeyrand B, et al. Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN2/3) in France. *Int J Cancer* 2008;122:424-427.
74. Sanjose SD, Almirall R, Loveras B, Font R, Diaz M, Munoz N, et al. Cervical Human Papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sexually Transmitted Diseases* 2003;30(10):788-793.
75. Ozturk 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.
76. Lindau ST, Drum ML, Gaumer E, Surawska H, Jordan JA. Prevalance of high risk human papillomavirus among older women. *Obstet Gynecol* 2008;112(5):979-989.
77. Roteli-Martins CM, de Carvalho NS, Naud P, Teixeira J, Borba P, Derchain S, et al. Prevalance of Human Papillomavirus infection and associated risk factors in young women in Brazil, Canada and the United States. *International Journal of Gynecological Pathology* 2011;30(2): 173-184.
78. Kahn JA, Lan D, Kahn RS. Sociodemographic factors associated with high risk Human Papillomavirus infection. *Obstet Gynecol* 2007;110:87-95.
79. Giovannelli L, Vassallo R, Matranga D, Affronti M, Caleca MP, Bellavia C, et al. Prevalance of cervical Human Papillomavirus infection and types among young women immigrated to Sicily, Italy. *Acta Obstetrica et Gynecologica* 2009;88:737-742.
80. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, et al. Condom use and the risk of genital Human Papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 2006;354(25):2645-2654.
81. Sanchez-Aleman MA, Uribe-Salas FJ, Lazcano-Ponce EC, Conde-Glez CJ. Human Papillomavirus incidence and risk factors among Mexican female collage students. *Sexually Transmitted Diseases* 2011;38(4):275-278.
82. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, Garcia PJ, Perez G. Risk factors for Human Papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine* 2008;26:16-36.