ARAŞTIRMA

Gülhane Tıp Derg 2014;56: 65-70
© Gülhane Askeri Tıp Akademisi 2014
doi: 10.5455/gulhane.41476

Üç Farklı Real-Time PCR Testinin Karşılaştırmalı Sonuçları: MY09/11 Primerleri Çoklu Enfeksiyonları Kaçırıyor

Fatih Şahiner (*), Kenan Şener (*), Ramazan Gümral (*), Mehmet Yapar (*), Murat Dede (**), Nuri Yiğit (***), Ayhan Kubar (****)

SUMMARY

The comparative results of three different real-time PCR assays: MY09/11 primers failed to detect multiple infections

HPV-DNA testing is widely used worldwide today and it has become an important part of cervical cancer screening programs. The aim of this study is re-evaluating the effectiveness of MY09/11 consensus primer system, which is one of the most widely used HPV-DNA tests, by using a different approach. In this study, MY09/11 consensus PCR and two different TaqMan-based type-specific PCR assays were used for investigation of the presence of 17 different HPV types in cervical smear samples. Of the 470 samples, 33.2% (156/470) were HPV-DNA positive by at least one of the three methods and remains were negative by all methods. A total of 220 different HPV isolates were identified in 149 samples by the type specific PCR, while the nine samples were positive by consensus PCR only. A single HPV type was detected in 64.4% (96/149) of the genotyped samples, and multiple HPV types were detected in the remaining 35.6% (53/149). MY09/11 PCR failed to detect 21.2% (33/156) of all HPV-DNA positive samples and the rates of false negative results were 18.75% (18/96) and 28.3% (15/53) in single and multiple infections, respectively. We conclude that highly sensitive type-specific PCR tests may be a useful tool for screening of cervical cancer.

Key Words: *HPV, real-time PCR, MY09/11, multiple infection*

ÖZET

Dünya genelinde yaygın olarak kullanılan HPV-DNA testleri günümüzde servikal kanser tarama programlarının önemli bir parçası haline gelmiştir. Bu çalışmanın temel amacı yaygın olarak kullanılan HPV-DNA testlerinden biri olan MY09/11 konsensus PCR'ın etkinliğini farklı bir yaklaşımla yeniden değerlendirmektir. Bu çalışmada, servikal smear örneklerinde MY09/11 PCR ve TaqMan-temelli iki ayrı tip spesifik PCR testi ile 17 farklı HPV tipinin varlığı araştırıldı. Çalışmaya dahil edilen 470 servikal smear örneğinin %33,2'si (156/470) üç yöntemden en az biri ile pozitif olarak değerlendirilirken, geriye kalan örnekler tüm yöntemler ile negatif olarak değerlendirildi. Tip spesifik PCR testleri ile pozitiflik saptanan 149 örnekte 220 farklı HPV izolatı identifiye edilirken, 9 örnek sadece konsensus PCR ile pozitif bulundu. Tiplendirme analizlerinin başarılı olarak yapıldığı örneklerin %64,4'ünde (96/149) tekli enfeksiyon ve %35,6'sında (53/149) çoklu enfeksiyon varlığı saptandı. MY09/11 PCR HPV-DNA pozitif örneklerin %21,2'sini (33/156) tespit edemezken, tekli ve çoklu enfeksiyonları kaçırma oranları sırasıyla %18,75(18/96) ve %28,3(15/53) olarak bulundu. Yüksek duyarlılığa sahip tip spesifik PCR testlerinin servikal kanser taramaları için güvenilir araçlar olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *HPV, real-time PCR, MY09/11, çoklu enfeksiyon*

*GATF Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
**GATF Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı.
***GATF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı.
****GATF Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Ayrı basım isteği: Fatih Şahiner, GATA Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Etlik/ Ankara
e-mail: fsahiner@gata.edu.tr
E-posta: fsahiner@gata.edu.tr

Makalenin Geliş Tarihi: 26.07.2013 • **Kabul Tarihi:** 26.08.2013 • **Çevrim İçi Basım Tarihi:** 20.06.2014

Giriş

Günümüze kadar 200'den fazla insan papillomavirus (HPV) genotipi tanımlanmış olup bunların tümü epitelyal dokulara tropizm gösterirler (1). HPV tipleri servikal kanser ile etiyolojik ilişkileri göz önüne alınarak (onkojenik potansiyellerine göre) yüksek riskli ve düşük riskli tipler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Düşük riskli HPV tipleri siğil ve kondilom gibi benign lezyonlara yol açarken, yüksek riskli tipler serviks kanseri başta olmak üzere çeşitli neoplastik lezyonlara neden olabilmektedir (2,3).

Dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen kanserlerden biri olan servikal kanserin aşı uygulamaları ve tarama testleri ile önlenebilir olması, başlıca sitopatolojik smear incelemeleri ve HPV-DNA testlerini içeren tarama testlerinin önemini arttırmıştır (4). HPV enfeksiyonlarının tanısı ve ilişkili lezyonların takibinde (yönetiminde) kullanılan tarama-tiplendirme yöntemlerinin ve kombine yaklaşımların seçimini kritik ve karmaşık hale getiren gerek yöntemsel gerekse enfeksiyon etkeni virüsün doğasından kaynaklanan çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Bunların en önemlileri çok sayıda farklı HPV tipinin (kırktan fazla) anogenital bölgede enfeksiyon etkeni olarak saptanabilmesi (2,5) ve viral genomun aynı HPV tipi içinde bile çok sayıda varyasyon gösterebilmesidir (6). Günümüzde klinik örneklerde HPV-DNA veya RNA (HPV E6-E7 mRNA) varlığının saptanması ve enfeksiyon etkeni genotip veya genotiplerin belirlenmesi için her biri farklı yaklaşım ve uygulamaları içeren çok sayıda tanı-tiplendirme yöntemi geliştirilmiştir (7). Bu yöntemlerin her birinin kendilerine özgü güçlü ve zayıf yanları bulunmaktadır. Konsensus PCR testleri diğer yöntemlere göre uygun maliyetli olmaları ve uygulama kolaylıkları ile dünya genelinde yaygın olarak kabul görmüştür. Bunlardan biri olan MY09/11 konsensus PCR yöntemi L1 gen bölgesinde yer alan yaklaşık 450 bp (base pairs; baz çifti) uzunluğundaki korunmuş bir bölgeyi hedeflemektedir (7). Dejenere primerlerin kullanıldığı bu yöntemin genital enfeksiyonlarda etken olarak saptanan 40'dan fazla HPV tipinin varlığını saptayabileceği öngörülmektedir (8). Bununla beraber, MY09/11 konsensus PCR araştırılan klinik örnekte hangi tip veya tiplerin bulunduğunu tanımlayamamaktadır. Bu nedenle tarama testi olarak MY09/11 PCR kullanıldığında pozitif olarak saptanan örneklerdeki tipleri belirlemek için blotlama, ters hibridizasyon, mikroarray hibridizasyon, lumineks temelli testler ve dizi analizi gibi MY09/11 PCR amplikonlarını kullanarak genotip tayini yapabilen ilave tiplendirme metotlarına gereksinim duyulur (9-12). Bir diğer tanısal yaklaşım tip spesifik primer ve probların kullanıldığı PCR testleridir. Bu testler HPV-DNA tespitini, kantitasyonunu ve tip tayinini aynı anda yapabilen duyarlılığı yüksek yöntemlerdir

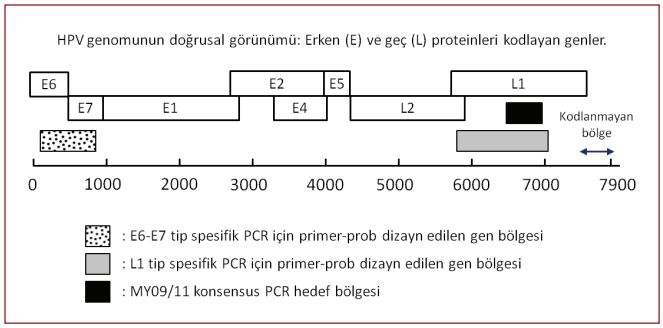
(13,14). HPV enfeksiyonlarının tanısında kullanılmak üzere geliştirilen tip spesifik PCR testlerinde özgün primer ve prob dizaynı için en sık tercih edilen hedef bölgeler L1, E6 ve E7 gen bölgeleridir (13-16). Bu çalışmanın temel amacı HPV enfeksiyonlarının tanısında yaygın olarak kullanılan MY09/11 konsensus PCR'ın etkinliğini iki ayrı tip spesifik PCR testi ile karşılaştırarak faklı bir yaklaşımla yeniden değerlendirmek ve HPV enfeksiyonlarının tanı ve takibinde kritik öneme sahip olduğunu düşündüğümüz yöntem seçiminin önemine dikkat çekmektir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya 2010-2012 yılları arasında HPV-DNA varlığı yönünden incelenmek üzere rutin analizler için laboratuvarımıza gönderilen 470 servikal smear örneği dahil edildi. Aynı hastaya ait tekrarlayan örnekler çalışma kapsamına alınmadı. Eksfoliye servikal hücreler sıvı bazlı ticari bir sistem (BD SurePath™ Pap Test, ABD) ile toplandı ve örnekler modifiye Bethesda sistemine göre sitolojik incelemeye tabi tutuldu (17). DNA izolasyonu standart alkali fenol-kloroform-izoamil alkol ekstraksiyon yöntemi ile yapıldı (18).

Konsensus PCR reaksiyonları: Tüm örnekler MY09/11 dejenere primerlerinin (MY09: 5'-cgtccmarrggawactgatc-3', MY11: 5'-gcmcagggwcataayaatgg-3') kullanıldığı SYBR green temelli bir real-time PCR metodu ile daha önce tanımlanmış olduğu şekilde test edildi (19). PCR döngüleri tamamlandıktan sonra reaksiyon tüpleri 55°C'den 95°C'ye ısıtılarak (ısı artışı 0,1°C/sn olacak şekilde) erime eğrisi döngüsü uygulandı. Optimizasyon çalışmaları ile MY09/11 primerleri için pozitif zirve değeri (melting temperature; Tm) 82±1,5°C olarak belirlendi ve Tm değeri bu aralıkta yer alan örnekler HPV-DNA varlığı yönünden pozitif olarak kabul edildi.

Tip spesifik PCR reaksiyonları: Tüm örnekler konsensus PCR ile pozitiflik olup olmadığına bakılmaksızın yüksek veya muhtemel yüksek riskli 15 HPV tipi için [HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 58, 59, 66, 68 ve 82] biri L1 ve diğeri E6-E7 gen bölgelerini hedefleyen tip spesifik primer ve probların kullanıldığı TaqMan temelli iki farklı real-time PCR yöntemi ile test edildi. L1 tip spesifik PCR testleri daha önce tanımladığımız bir yönteme (14) ve E6-E7 tip spesifik PCR testleri bir tez çalışması sırasında tanımladığımız diğer bir yönteme (20) uygun olarak gerçekleştirildi. Her iki yöntemin taradığı tip sayısı yeni dizayn edilen primer ve problar ile genişletildi. En sık görülen düşük riskli tipler olan HPV-6 ve HPV-11 ise sadece L1 gen bölgesini hedefleyen özgün primerlerin ve ortak bir probun kullanıldığı real-time PCR temelli diğer bir yönteme göre her örnekte ayrıca araştırıldı (14). HPV tiplerine göre değişmek üzere L1 tip spesifik PCR testleri için uzunlukları 125 ila 178 bp ve E6-E7 tip spesifik PCR testleri için uzunlukları 90 ila 167 bp arasında değişen sekansları hedefleyen primerler dizayn edildi (Şekil 1). Reaksiyon karışımı 1,25 U hot start taq DNA polimeraz (Bioron, Almanya), her bir primerden 10 pmol, 2,5 pmol TaqMan prob, 0,2 mM dNTP miks ve 2,5 mM $MgCl_2$ içerecek şekilde hazırlandı. PCR reaksiyonları bu karışıma hedef DNA içeren örnek ilavesiyle toplam 25 µl hacimde gerçekleştirildi. Amplifikasyon döngüleri 95°C'de 10 dk 1 döngü (hot-start taq DNA polimeraz aktivasyonu için) ve takiben 95°C'de 15 sn ve 60°C'de 1 dk olmak üzere 40 döngü olarak gerçekleştirildi. Tüm primer ve problar OligoYap 4.0 yazılım programıyla dizayn edildi (21). Dizilerin özgünlükleri internet yardımıyla GenBank'ın BLAST özelliği ile kontrol edildi ve MWG-Biotech (Ebersberg, Almanya) firmasına sentezlettirildi.



Şekil 1: L1 ve E6-E7 tip spesifik PCR testleri için primer-prob dizaynı yapılan gen bölgeleri ve MY09/11 primerleri ile hedeflenen korunmuş gen bölgesi. KB: Kodlanmayan Bölge. (7 nolu kaynaktan uyarlanmıştır).

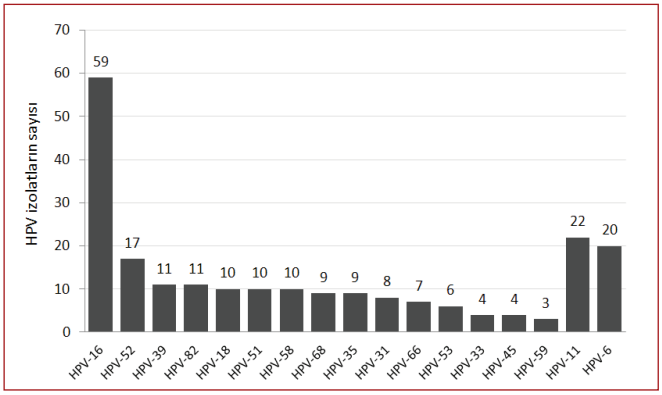
Tüm PCR testlerinde negatif kontrol olarak hedef DNA içermeyen bir örnek ve pozitif kontrol olarak da laboratuvarımız koleksiyonunda bulunan örnekler kullanıldı. Yanlış pozitif sonuçları önlemek için tüm testler standart önlemler dikkate alınarak çalışıldı. İnternal kontrol olarak insan gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) gen gölgesini hedefleyen primerler ve özgün bir prob kullanıldı (14). İnternal kontrol ile pozitiflik saptanmayan örnekler çalışma dışı bırakıldı. Tüm PCR işlemleri ve analizler ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi.

Bulgular

Çalışma grubu yaş ortalaması 37,6 (±8,7), ortanca değeri 37 ve dağılım aralığı 17-72 olan hastalardan oluşmaktadır. Örneklerin %33,2'si (156/470) çalışmada kullanılan üç yöntemden en az biri ile HPV-DNA pozitif olarak tanımlanırken, %66,8'i (314/470) her üç yöntem ile de negatif olarak değerlendirildi. Yöntemlerinden en az biri ile HPV-DNA saptanan örnekler "pozitif" ve her üç yöntem ile negatif bulunan örnekler "negatif" olarak kabul edilmek koşulu ile MY09/11 PCR ve L1 tip spesifik PCR'ın göreceli duyarlılıkları sırası ile %78,8 (123/156) ve %95,5 (149/156) olarak bulundu. Bu çalışmada kullanılan E6-E7 tip spesifik PCR yöntemi HPV-6 ve HPV-11'e yönelik primer-prob içermediğinden dolayı, düşük riskli bu tipler hariç tutulmak üzere çalışma kapsamına dahil edilen diğer 15 HPV tipi için L1 tip spesifik PCR'ın HPV-DNA pozitif olarak tanımladığı tüm örnekler E6-E7 tip spesifik PCR ile de pozitif olarak bulundu. Aynı şekilde L1 tip spesifik PCR ile negatif olarak tanımlanan tüm örnekler E6-E7 tip spesifik PCR ile de negatif olarak değerlendirildi (kappa değeri: 1,000). Bununla beraber, L1 tip spesifik PCR çoklu enfeksiyonların birinde etken tiplerden birini (HPV-39) saptayamazken, yine iki ayrı çoklu enfeksiyonda E6-E7 tip spesifik PCR etken tiplerden birer tanesini (birinde HPV-52 ve diğerinde HPV-59) saptayamamıştır (Tablo I).

MY09/11 PCR yöntemi HPV pozitif örneklerin %21,2'sinde (33/156) HPV-DNA varlığını tespit edemezken, çoklu ve tekli

enfeksiyonları kaçırma oranları sırasıyla %28,3 (15/53) ve %18,8 (18/96) olarak bulundu. Örneklerin %4,5'inde (7/156) ise sadece MY09/11 PCR ile HPV-DNA varlığı saptandı ve tiplendirme yapılamadı. Tiplendirme analizlerinin başarılı olarak yapıldığı HPV pozitif 149 örneğin %64,4'ünde (96/149) tekli enfeksiyon ve %35,6'sında (53/149) çoklu enfeksiyon varlığı saptandı ve L1 ve E6-E7 tip spesifik PCR yöntemleri ile toplamda 220 farklı HPV izolatı genotip düzeyinde tanımlandı. Tip spesifik PCR yöntemleri ile tanımlanan tiplerin bir havuzda toplanması ile elde edilen genotip dağılımı yanda gösterilmiştir (Şekil 2). Eş zamanlı olarak birlikte saptanan tipler (ko-enfeksiyon paternleri) ve bu tip birlikteliklerinin her iki tip spesifik PCR yöntemi ile pozitif olarak saptanma durumu (sayısı) ise aşağıda Tablo I'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. Tip spesifik PCR testleri ile tanımlanan HPV genotiplerinin sayısal dağılımı.

Tablo I: *Smear örneklerinde tip spesifik PCR ile saptanan HPV tipleri ve ko-enfeksiyon paternleri*

Tekli enfeksiyonlar (96)	Çoklu enfeksiyonlar (53)		
	HR-HPV/HR-HPV*	HR-HPV/LR-HPV	LR-HPV/LR-HPV
Tip 6 (7)	Tip 16, 18 (1)	Tip 6, 35 (1)	Tip 6, 11 (5)
Tip 11 (9)	Tip 16, 33 (2)	Tip 6, 52 (1)	
Tip 16 (35)	Tip 16, 35 (2)	Tip 6, 58 (1)	
Tip 18 (2)	Tip 16, 39 (2)	Tip 6, 82 (1)	
Tip 31 (4)	Tip 16, 51 (3)	Tip 11, 16 (3)	
Tip 33 (1)	Tip 16, 66 (2)	Tip 11, 39 (1)	
Tip 35 (2)	Tip 16, 82 (2)	Tip 11, 68 (1)	
Tip 39 (4)	Tip 18, 31 (1)	Tip 6, 11, 53 (1)	
Tip 51 (5)	Tip 18, 35 (1)	Tip 6, 16, 35 (1)	
Tip 52 (9)	Tip 18, 52 (1)	Tip 6, 16, 52*** (1)	
Tip 53 (3)	Tip 18, 58 (1)	Tip 6, 51, 82 (1)	
Tip 58 (4)	Tip 31, 58 (1)	Tip 11, 16, 82 (1)	
Tip 66 (3)	Tip 35, 59 (1)	Tip 11, 39, 68 (1)	
Tip 68 (4)	Tip 39, 68 (1)		
Tip 82 (4)	Tip 45, 52 (1)		
	Tip 45, 68 (1)		
	Tip 53, 66 (1)		
	Tip 16, 18, 45 (1)		
	Tip 16, 31, 33 (1)		
	Tip 18, 52, 68 (1)		
	Tip 31, 52, 58 (1)		
	Tip 35, 66, 82 (1)		
	Tip 39**, 52, 58 (1)		
	Tip 51, 59, 82 (1)		
	Tip 16, 39, 45, 59*** (1)		
	Tip 16, 18, 52, 53, 58 (1)		

Parantez içerisinde gösterilen rakamlar örnek sayısını ifade etmektedir. *Muhtemel yüksek riskli HPV tipleri HR-HPV tipleri ile beraber gösterilmiştir. **L1 tip spesifik PCR ile saptanamamıştır. *** E6-E7 tip spesifik PCR ile saptanamamıştır.

Çalışmaya dahil edilen tüm örneklerde %21,9 (103/470) olarak bulunan sitolojik atipi görülme oranı, HPV-DNA pozitif örneklerde %52,6 (82/156) ve HPV-DNA negatif örneklerde %6,7 (21/314) olarak belirlendi. Tiplendirme yapılan HPV-DNA pozitif 149 örnek baz alındığında ise anormal sitoloji görülme oranı tekli ve çoklu enfeksiyonlarda sırasıyla %46,9 (45/96) ve %69,8 (37/53) olarak bulundu. MY09/11 PCR ile kaçırılan 33 örneğin alındığı hastalara endoservikal biyopsi uygulanma durumu retrospektif olarak araştırıldı ve şüpheli servikal lezyonları olan 16 hastaya biyopsi yapıldığı belirlendi. Bu hastalara ait biyopsilerin 3'ünün normal, 2'sinin kondilomatöz lezyon ve 11'inin servikal intraepitelyal lezyon (3'ü CIN-1, 6'sı CIN-2 ve 2'si CIN3 olmak üzere) olarak değerlendirildiği belirlendi.

Tartışma

Günümüzde ilk olarak klinik örneklerde tek reaksiyonda en fazla HPV tipini amplifiye edebilecek şekilde tasarlanan konsensus primerler ile (MY09/11, GP5+/6+, PGMY09/11 ve SPF-10 gibi) genel bir tarama yapılması ve sonrasında bu testlerle pozitiflik saptanan örneklerde spesifik tip tayini yapabilen yöntemlere başvurulması maliyet ve iş-gücünü azaltmak için sık başvurulan bir yaklaşım olmuştur (8). Ancak bu yaklaşımın aşı veya takip çalışmalarında önemli sonuçlar doğuracak olan verilerin atlanmasına neden olabileceği unutulmamalıdır. HPV enfeksiyonlarının tanı ve takibinde sık kullanılan bir yöntem olan MY09/11 PCR'ın çeşitli çalışmalarla ortaya konan düşük duyarlılık problemi bahsi geçen olumsuz sonuçlara neden olabilecek önemli bir dezavantaj olarak gözükmektedir (9,13,14). Çalışmamız sonuçları bilinen düşük duyarlılık problemini desteklemekle beraber çoklu enfeksiyonlarda MY09/11 konsensus PCR'ın yanlış negatiflik oranının beklenenden daha yüksek olabileceğini göstermektedir.

Bazı çalışmalarda MY09/11 PCR'ın çoklu HPV enfeksiyonlarını kaçırdığına dair veriler yer almakla birlikte bu konu çok fazla tartışılmamıştır. Örneğin, 16 onkojenik HPV tipini saptayacak şekilde tasarlanan bir tip spesifik PCR yönteminin MY09/11 konsensus PCR ile karşılaştırıldığı geniş kapsamlı bir çalışmada MY09/11 PCR'ın ikili enfeksiyonların %5,4'ünü ve üçlü enfeksiyonların %1,36'sını kaçırdığı bildirilmiştir (13). Bahsi geçen çalışmada çoklu enfeksiyon oranı bizim çalışmamıza göre belirgin olarak düşük olduğundan dolayı (%12,0'ye karşın %35,6), bu çalışmada MY09/11 PCR'ın çoklu enfeksiyonları kaçırma oranı bizim verilerimize göre daha düşük bulunmuş olabilir. Bunun dışında, iki ayrı konsensus PCR yönteminin (MY09/11 ve GP5+/6+) karşılaştırıldığı ve çoklu enfeksiyon oranının %29,4 olarak bulunduğu diğer bir çalışmada MY09/11 PCR'ın çoklu enfeksiyonların %10'unu (3/30) saptayamadığı bildirilmiştir (22). Bu çalışmada kullanılan her iki yöntemin de duyarlılığı göreceli olarak düşük konsensus PCR testleri olması ve çalışma grubunun küçüklüğü nedeniyle bu çalışmanın verileri MY-09/11 PCR'ın çoklu enfeksiyonları saptama etkinliğini ortaya koymak için yetersiz olabilir, ancak bu çalışmanın verileri çoklu enfeksiyonların önemli bir bölümünün MY-09/11 PCR ile kaçırıldığını göstermesi bakımından değerlidir. Üçüncü bir örnek olarak verebileceğimiz ve yine iki ayrı konsensus primer sisteminin (MY09/11 ve PGMY09/11) karşılaştırıldığı bir çalışmada MY09/11 PCR yöntemi ile hem çoklu enfeksiyon oranı daha düşük olarak bulunmuş (%33,8'e karşın %40), hem de PGMY09/11 ile pozitiflik saptanan üç çoklu enfeksiyon (HPV-42 ve 51; HPV-31, 54 ve 66; HPV-6, 33 ve 45) MY09/11 PCR ile negatif olarak değerlendirilmiştir (9). Farklı örneklerle çoğaltılabilecek bu veriler MY09/11 primerlerinin çoklu enfeksiyonları kaçırdığı yönündeki bulgularımızı desteklemektedir.

MY09/11 primerleri dizayn edildiği zaman HPV tiplerinden sadece HPV-6, 11, 16, 18 ve 33 biliniyordu ve sistem öncelikle bu beş türü saptayacak şekilde tasarlanmıştır. Diğer tiplerde görülebilecek primer-hedef yanlış eşleşmelerinin MY09/11 PCR'ın duyarlılığında azalmaya neden olabileceği bildirilmiştir (13,23). Ancak, yukarıdaki üçüncü örnek daha ayrıntılı olarak incelendiğinde HPV tip 6, 33 ve 45'i içeren bir enfeksiyonun MY09/11 PCR tarafından kaçırılması, yüksek derecede baz uyumluluğu olan tiplerin dahi çoklu enfeksiyonun bir parçası olduklarında yanlış negatif olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (9). MY09/11 primer sistemi teorik olarak genital örneklerde en fazla sayıda HPV tipini saptayabilecek şekilde tasarlanmıştır ve her ayrı lot numaralı seride konsantrasyonları kesin olarak belli olmayan 24 farklı primer sekansı bulunmaktadır. Bu durum PCR reaksiyonunu tek başına zaten karmaşıklaştırmaktadır. Bir klinik örnekte kopya sayıları değişken çok sayıda farklı HPV tipinin bulunması durumunda ise reaksiyonun daha da karmaşık bir hal alacağını ve farklı tiplere ait paralel yürüyen DNA sentezlerinin reaksiyon karışımında bulunan temel bileşenlerin tükenmesine ve reaksiyon dinamiklerinin bozulmasına neden olarak PCR verimliliğini olumsuz olarak etkileyeceğini düşünmekteyiz. Farklı türlerden mikrobiyal etkenlerin araştırıldığı bir multipleks PCR reaksiyonunun aksine, identik olmamakla beraber genom dizileri birbirine yüksek oranda benzeyen farklı HPV tiplerinin varlığında reaksiyonun hangi primer çifti (diğer bir ifade ile hangi tip) üzerinden devam edeceği karmaşıktır. Ayrıca böylesi bir durumda her denatürasyon basamağı sonrası primerlerin farklı türlere ait hedef sekanslara nonspesifik bağlanmalarının neden olduğu amplifikasyon inhibisyonu da önemli bir olasılık olarak gözükmektedir. MY09/11 ve PGMY09/11 PCR amplikonlarının tiplendirildiği bir çalışmada MY09/11 PCR'da reaksiyonun bazı tipler üzerinden baskın olarak devam etmesinin mevcut diğer tip/tiplerin kaçırılmasına yol açtığı ve saptanan tip sayısının ve buna paralel olarak çoklu enfeksiyon oranının olduğundan daha düşük bulunmasına yol açtığı gösterilmiştir (9). Bu nedenle, düşük duyarlılığa sahip olması nedeniyle MY09/11 PCR HPV pozitif örnekleri kaçırdığı gibi, MY09/11 PCR amplikonları üzerinden tiplendirme yapan tanı yöntemlerinin bazı tipleri kaçırabileceği de dikkate alınması gereken bir diğer önemli noktadır (10).

MY09/11 PCR duyarlılığının düşük olmasının muhtemel bir sebebi de amplikon uzunluğunun göreceli olarak büyük (yaklaşık 450 bp) olmasıdır (13). Amplikon büyüklüğünün artması PCR reaksiyonunun verimliliğini azaltabildiği gibi, yüksek riskli HPV tipleri insan genomuna entegre olabildiği için hedeflenen sekansın uzunluğu arttıkça bütünlüğü bozulmuş hedef varlığı olasılığı da artmaktadır. Bu olasılığı azaltmak

amacıyla çalışmamızda L1 ve E6-E7 tip spesifik PCR testleri için 90-178 bp uzunluğundaki özgün sekansları hedefleyen primerler dizayn edilerek kullanılmıştır.

Tip spesifik PCR testleri ile HPV-DNA varlığının araştırıldığı çalışmalarda tipe özgü primer dizaynı için genellikle L1 ve E6-E7 gen bölgeleri tercih edilmektedir (13-16). Bazı çalışmalarda L1 gen bölgesinin entegrasyon nedeniyle parçalanabileceği ve E6-E7 gen bölgelerinin her zaman intakt olması ve sekans varyasyonlarının daha az sıklıkta görülmesi nedeniyle primer dizaynı için avantajlı olabileceği öne sürülmüştür (13,24). Her iki gen bölgesini hedefleyen konsensus PCR testlerini birbiri ile (22,25) ve L1 konsensus primerlerini E6-E7 tip spesifik PCR testleri ile (13,26-28) karşılaştıran çalışmalar bulunmakla birlikte, bu makalenin yazım aşamasında yaptığımız literatür incelemelerinde L1 ve E6-E7 gen bölgelerinin tip spesifik primer dizaynı için tercih edilebilirliklerini ortaya koymak için bu bölgeleri hedefleyen primerleri doğrudan birbiri ile karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda her iki gen bölgesini hedefleyen iki ayrı tip spesifik PCR testi ile benzer ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmiştir. Laboratuvar tecrübelerimize ve bu çalışmanın verilerine dayanarak uygun primer dizaynı yapıldığı takdirde her iki gen bölgesinin de HPV tip spesifik primer ve prob dizaynı için tercih edilebilir olduğunu düşünmekteyiz.

Üniversite öğrencileri üzerinde yapılan prospektif bir çalışmada, HPV enfeksiyonunu takiben 12 aydan sonra kadınların yaklaşık %70'inde tespit edilebilir düzeylerde HPV-DNA saptanamadığı ve 18 aydan sonra enfeksiyonların %80'in üzerinde temizlendiği gösterilmiştir (29). HPV enfeksiyonlarının büyük çoğunluğunun patolojik değişikliklere neden olmadan temizlendiği geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmalarla da ortaya konmuştur (30,31). Türkiye'deki HPV tip dağılımını gösteren kapsamlı araştırmalardan biri olan çalışmamızda anormal sitoloji görülme oranının yüksek olarak bulunmasının bir nedeni çalışma grubunun rutin tarama yaptıran kadınlar ile beraber semptomatik hastaları da içermesidir. Çeşitli çalışmalarda çoklu tip varlığının sitolojik atipi görülme oranındaki artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (14,32). Çalışmamızda sitolojik atipi görülme oranı HPV-DNA pozitif örneklerde HPV negatif örneklere göre (%52,6 ve %6,7) ve çoklu enfeksiyonlarda tekli enfeksiyonlara göre (%69,8 ve %46,9) daha yüksek oranda bulunmuştur. MY09/11 PCR yönteminin CIN-2 ve CIN-3 lezyonlarının görüldüğü enfeksiyonlar da dahil olmak üzere sitolojik atipi görülme oranının daha yüksek olduğu çoklu enfeksiyonların önemli bir bölümünü kaçırdığını gösteren çalışma bulgularımız düşük duyarlılığa sahip bir yöntemin servikal kanser ile ilişkili bir enfeksiyon için tarama testi olarak tercih edilmesi durumunda karşılaşılacak olumsuz klinik sonuçların önemini açıkça göstermektedir.

Sonuç olarak, yüksek duyarlılığa sahip olmaları yanında genotip düzeyinde tanımlama yaparak HPV enfeksiyonlarının izlenmesine (persistansın gösterilmesi, yeni veya tekrarlayan enfeksiyon ayırımının yapılması) ve kanseröz transformasyon riskinin belirlenmesine olanak sağlamaları nedeniyle tip spesifik real-time PCR testlerinin HPV enfeksiyonlarının tanı ve takibinde hasta bazında daha değerli ve güvenilir sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Conway MJ, Meyers C. Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. J Dent Res 2009; 88(4): 307-17.
2. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology 2004; 324(1): 17-27.
3. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348(6): 518-27.
4. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. Nat Clin Pract Oncol 2008; 5(1): 24-31.
5. zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. J Cancer Res Clin Oncol 1996; 122(1): 3-13.
6. Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. Int J Cancer 1999; 82(2): 203-7.
7. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. J Clin Virol 2005; 32 (Suppl 1): S43-51.
8. Gravitt PE, Viscidi RP. Measurement of Exposure to Human Papillomaviruses. In: Rohan TE, Shah KV (eds). Cervical Cancer: From Etiology to Prevention (Cancer Prevention-Cancer Causes). Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004: Chapter 5; 119-41.
9. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. J Clin Microbiol 2000; 38(1): 357-61.
10. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. J Clin Microbiol 1999; 37(8): 2508-17.
11. Qi SZ, Wang QQ, Tan Y,et al. Genotyping of genital human papillomavirus by DNA sequencing and luminex methods. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 2007; 29(2): 181-5.
12. Shen-Gunther J, Rebeles J. Genotyping human papillomaviruses: development and evaluation of a comprehensive DNA microarray. Gynecol Oncol. 2013; 128(3): 433-41.
13. Depuydt CE, Boulet GA, Horvath CA, Benoy IH, Vereecken AJ, Bogers JJ. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the

detection of oncogenic HPV types. J Cell Mol Med 2007; 11(4): 881-91.

14. Şahiner F, Gümral R, Şener K ve ark. Servikal Sürüntü Örneklerinde İki Farklı Yöntemle HPV-DNA Varlığının Araştırılması: MY09/11 Konsensus PCR ve Tipe Özgül Gerçek Zamanlı PCR. Mikrobiyol Bul 2012; 46(4): 624-36.
15. Dictor M, Warenholt J. Single-tube multiplex PCR using type-specific E6/E7 primers and capillary electrophoresis genotypes 21 human papillomaviruses in neoplasia. Infect Agent Cancer 2011; 6(1): 1.
16. Lee JH, Lee NW, Hong SW, Nam YS, Choi JW, Kim YS. Establishment of an efficient multiplex real-time PCR assay for human papillomavirus genotyping in cervical cytology specimens: comparison with hybrid capture II. Cytopathology 2011; 22(4): 261-68.
17. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA 2002; 287: 2114-9.
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Isolation of DNA from mammalian cells. In: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds). 2nd ed. Vol 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 9.16-9.19.
19. Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital HPV infection using consensus PCR, In: Herrington CS, McGee JO'D (eds). Diagnostic molecular pathology: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1992: 131-52.
20. Şahiner F. Tipe özgü multipleks real-time PCR ile yaygın görülen yüksek riskli HPV'lerin saptanması, GATA Askeri Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tıbbi Viroloji BD, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2012.
21. Yapar M, Aydogan H, Pahsa A, et al. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. Japanese J Infect Dis 2005; 58: 358-62.
22. Qu W, Jiang G, Cruz Y, et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. J Clin Microbiol 1997; 35(6): 1304-10.
23. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. Cancer Cells 1989; 7: 209-14.
24. Morris BJ. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. Clin Chem Lab Med 2005; 43(11): 1171-7.
25. Gillio-Tos A, De Marco L, Ghisetti V, et al. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. J Clin Virol 2006; 36(2): 126-32.
26. Martró E, Valencia MJ, Tarrats A, et al. Comparison between two human papillomavirus genotyping assays targeting the L1 or E6/E7 region in cervical cancer biopsies. Enferm Infecc Microbiol Clin 2012; 30(5): 225-9.
27. Noffsinger AE, Suzuk L, Hui YZ, Gal AA, Fenoglio-Preiser CM. Differential sensitivities of E6 type-specific and L1 consensus primers in the detection of human papillomavirus in anal carcinoma. Mod Pathol 1995; 8(5): 509-14.
28. Park JS, Namkoong SE, Han SK, Nha DJ, Lee HY, Kim SJ. Comparison of L1 consensus primers with E6 type specific primers for detection of human papillomaviruses in paraffin sections of cervical neoplasia. J Korean Med Sci 1993; 8(1): 60-7.
29. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med 1998; 338(7): 423-8.
30. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol 2005; 32(Suppl 1): S16-24.
31. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002 cancer incidence, Mortality and prevalence worldwide. In: IARC Cancer Base No. 5 version 2.0. Lyon: IARC Press, 2004.
32. Rousseau MC, Villa LL, Costa MC, Abrahamowicz M, Rohan TE, Franco E. Occurrence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities. Sex Transm Dis 2003; 30(7): 581-7.