



Human Papillomavirüs DNA Pozitif ve E6/E7 mRNA Negatif, Anormal Sitolojili Servikal Örneklerin Genotiplendirilmesi

Aylin Altay Koçak¹, İpek Tüney², Koray Ergünay², Alp Usubütün³, Kunter Yüce⁴, Ahmet Pınar², Irene Görzer⁵, Elisabeth Puchhammer-Stöckl⁵, Gülendamar Bozdayı¹

¹Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji AD, Ankara

⁴Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Ankara

⁵Medical University Vienna, Department of Virology, Viyana, AVUSTURYA

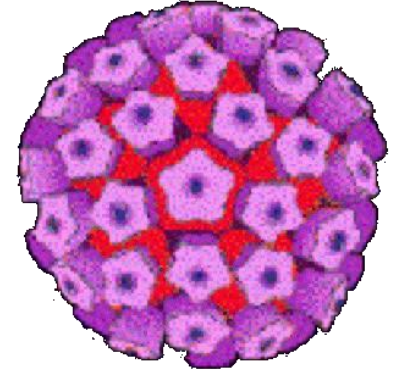
Giriş



- **Medical University Vienna**
- **Dept. of Virology**
- **Prof. Dr. Elisabeth Puchhammer-Stöckl**



Giriş

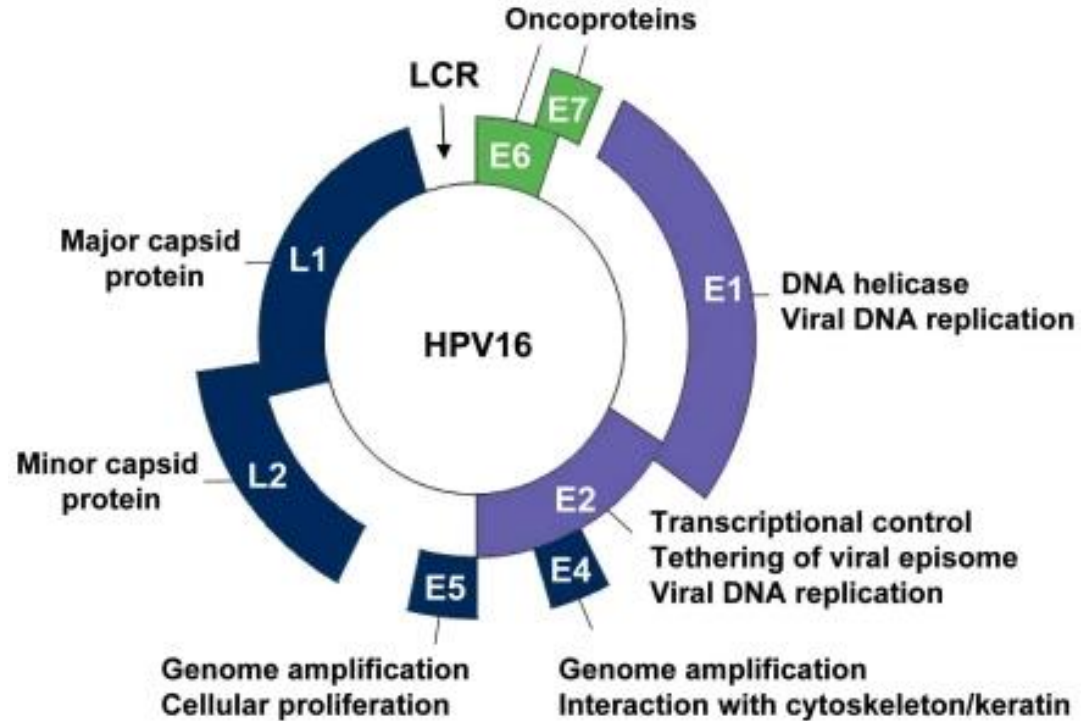


- Human papillomavirüs (HPV)
- Papillomaviridea ailesi
- Zarfsız, çift zincirli DNA
- Deri ve mukozaların bazal tabakalarını enfekte eden bir virüs
- **Serviks kanseri**
- Onkojenik tipler: **16,18,31,33,35,39,45,...**

Giriş

Genomik Yapısı:

- **E6:** En önemli görevi tümör supressör protein olan p53'ü inaktive etmektir.
- **E7:** Rb tümör supressör proteinlerinin inaktivasyonundan sorumludur. Enfekte hücrenin telomerazını aktive ederek hücreye ölümsüzlük kazandırır.



Giriş

Tanı Yöntemleri:

- Nükleik asit amplifikasyon testleri
 - Genellikle HPV DNA'nın L1 bölgesini hedef alan PCR yöntemleri
 - E6/E7 mRNA'yı hedef alan amplifikasyon yöntemleri
- Pozitifliği onkojenik aktiviteyi gösterdiği için daha prediktif olabilir
- Klinik özgüllüğü DNA testlerinden yüksektir

Amaç

- HPV E6/E7 onkogen ekspresyonunun saptanması, yüksek riskli lezyonlara ilerleme riskinin belirlenmesinde umut verici bir biomarker olarak ortaya çıkmıştır
- Bu çalışmada, daha önceki çalışmamızda HPV DNA pozitif ve mRNA negatif bulunan örneklerin genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır

Gereç ve Yöntemler

- Önceki çalışmamızda HPV mRNA ve DNA varlığı değerlendirilen anormal sitolojili servikal sürüntü örnekleri
- Hacettepe Üni. Hastanesi, Kadın Hast.-Doğum Polikliniği
- 2011 Ocak-Ekim arasında başvurmuş hastalar



Gereç ve Yöntemler

Nükleik asit ekstraksiyonu:

- Manyetik boncuk temelli, otomatik, ticari bir sistem ile yapılmıştır (NucliSENS easyMAG, bioMerieux, France)

HPV DNA ve E6/E7 mRNA saptanması:

- Real-time PCR (Heliosis HPV LC PCR Kit, Metis Biyoteknoloji, Türkiye)
- NASBA yöntemi (NucliSENS EasyQ HPV v1.1, bioMerieux, France)

Gereç ve Yöntemler

- HPV-18, 31, 33, 35, 39 ve 45'in genotiplendirilmesi için tipe özgü PGMY primerleri (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)
- E6/E7 geninin saptanması için E6/E7 consensus primerleri (Heliks Biotechnology, Türkiye)
- in house PCR yöntemi (PCR mastermix, Promega, ABD)

Gereç ve Yöntemler

- Primer dizileri, BioEdit 3.0 programında HPV referans suşları ile karşılaştırılarak kontrol edilmiştir
- Sonuçların konfirmasyonu, '**LineProbe**' yöntemi (INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp, Innogenetics, Belgium) ile (SPF10 primeri) yapılmıştır

Bulgular

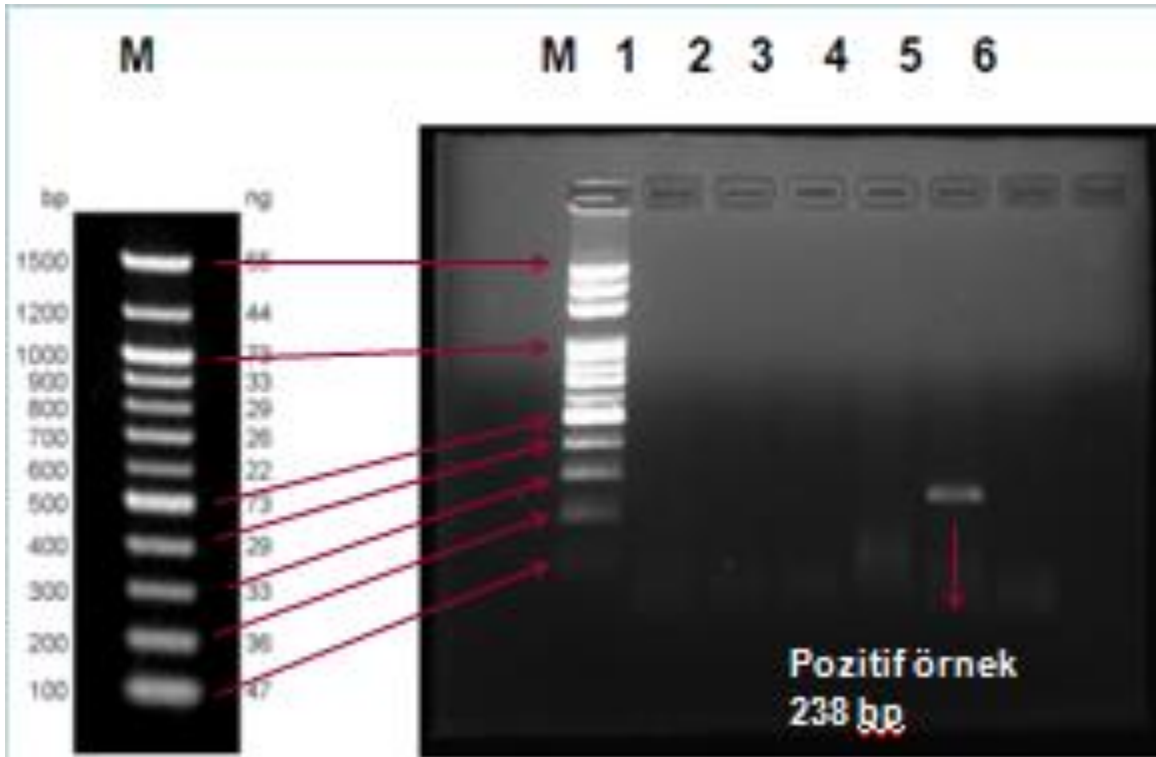
- Önceki çalışma grubu, 81 anormal sitolojili kadın hastadan oluşmaktadır.
- Örneklerin 73'ünde (%90.1) HPV DNA:
 - 46'sı (%63.1) HPV-16,
 - 15'i (%20.5) HPV-16 dışı tipler,
 - 12'si (%16.4) miks tipler

Bulgular

- E6/E7 mRNA ekspresyonu ise 45 (%55.6) örnekte
- Bu sonuçlara göre, **toplam 43 örnek** olmak üzere;
 - 28 HPV mRNA negatif, tip-16 DNA pozitif ve
 - 15 tip-16 dışı DNA pozitif örneğin genotipleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Bulgular

- HPV E6/E7 consensus primerleriyle, 43 örneğin 5'i(%12) pozitif bulunmuştur. Bunların 4'ü HPV-16 genotipine, 1'i ise tip-16 dışı pozitifliğe sahipti.

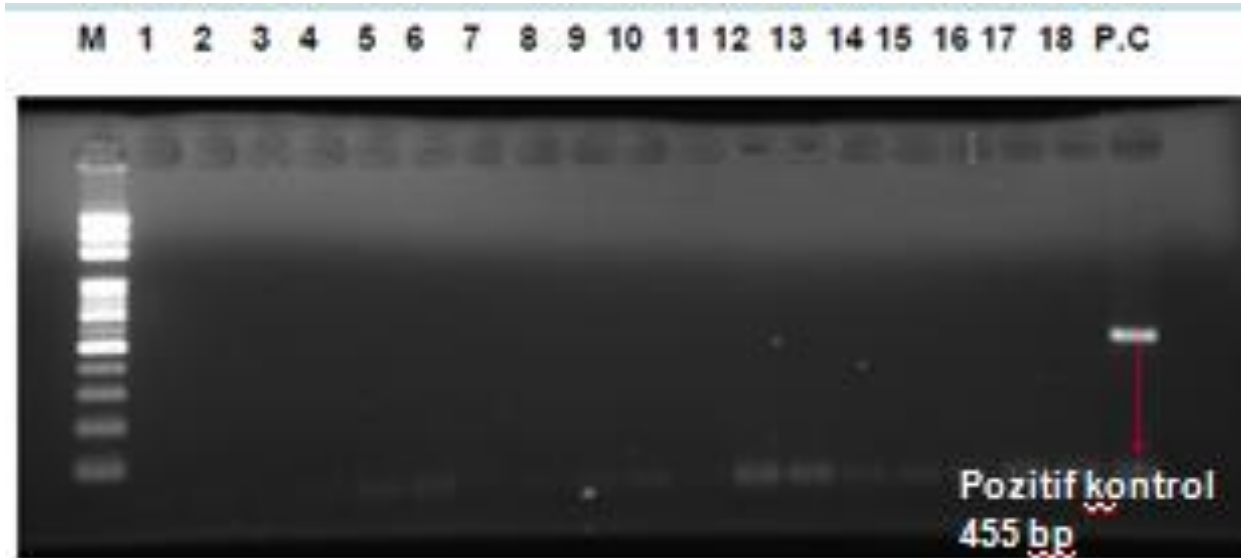


Bulgular

- Genotip 18, 31, 33, 39 ve 45'e ait pozitif kontroller ile PCR optimizasyonları yapıldı
- Ancak, tip 33'ün pozitif kontrolü çalışmadı ve HPV-33 için yeni bir primer (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) tasarlandı, ancak çeşitli PCR koşullarında denenmesine rağmen optimize edilemedi

Bulgular







- 43 örneğin hepsi genotip 18, 31, 33, 39 ve 45 için negatif bulundu.



Bulgular

- 2 örnekte ise HPV-33 ve başka 2 örnekte HPV-39 saptandı
- Ancak bu 4 örneğin hiçbirinde bu genotipler, PCR yöntemi ile saptanamamıştır
- Sınırlı miktardaki örnek hacmi nedeni ile de tüm örnekler LiPA ile çalışılamamıştır



Tartışma

- Szostek ve ark., 2006
- 125 servikal sürüntü örneğinde, L1 ve E6-E7 bölgelerine özgü farklı primerler kullanarak,
- Hybrid Capture ve PCR yöntemleri ile HPV varlığını araştırmışlardır:
- SPF10  %72'sinde HPV DNA (+)
- MY09/11  %58'inde HPV DNA (+)
- HC  %55'i HPV DNA (+)
- pU-1M/pU-2R  %39'u HPV DNA (+)
- Örneklerin %12'si sadece **SPF10** ile pozitif  **En duyarlı**
- **MY09/11**  **En özgül**

Tartışma

- Dictor ve ark., 2011
- 101 CIN2 ve ↑ örnekte 19 HR, 2 LR tipe özgü **E6/E7 primerleri** ile E6/E7 genini araştırmışlardır
- Tümörlerin % **69**'undan **HPV 16 ve 18**'in sorumlu olduğu görülmüştür

Tartışma

- Besic ve ark., 2013
- HC2 ve Real Time PCR (Abbott) ile HR HPV pozitif bulunan 105 örnekte **tipe özgü HPV DNA** testi ile **E6/E7 mRNA** testini HPV 16, 18, 31, 33, 45 tipleri için karşılaştırmışlardır:
 - HPV High Risk Typing Real-TM test (Sacace Biotechnologies, Como, Italy)  **%72.4 (76/105)**
 - NASBA yöntemi (NucliSENSEasyQ[®] HPV v1.1, bioMérieux, Lyon, France)  **%85.5 (65/76)**

Sonuç

- ✓ LiPA bulgularına göre, örneklerin bir kısmı HPV 18, 31, 33, 39 ve 45 genotiplerinden farklı olduğu için PCR ile negatif bulunmuştur.
- ✓ Bunun yanında, LiPA 65 baz çiftlik bir gen bölgesini amplifiye etmekte ve duyarlılığı, 238 ve 455 baz çifti uzunluktaki gen bölgelerini çoğaltan PCR yöntemlerimizden daha yüksek olabilir.
- ✓ Ayrıca, E6/E7 gen bölgesi, L1 bölgesi kadar korunmuş olmadığı için E6/E7 PCR yöntemi ile bazı pozitiflikleri kaçırmış olabileceğimizi düşünmekteyiz.

Prof. Dr. Gülendir BOZDAYI
ve
Prof. Dr. Elisabeth Puchhammer-Stöckl'e
Teşekkür ederim...

