

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

Genotyping of HPV DNA Positive and HPV E6/E7 mRNA Negative Cervical Samples with Abnormal Cytology

Aylin Altay Koçak*¹, İpek Tüney**¹, Koray Ergunay**¹, Alp Usubütün***¹, Kunter Yüce****¹
Irene Görzer*****¹, Elisabeth Puchhammer-Stöckl*****², Güleendam Bozdayı*****³

*Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

***Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

****Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

*****Medical University Vienna, Department of Virology, Viyana, Avusturya

*****Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

Atf/Cite as: Altay Koçak A, Tüney İ, Ergunay K, Usubütün A, Yüce K, Görzer I, Puschhammer-Stöckl E, Bozdayı G. Human papillomavirüs DNA pozitif ve E6/E7 mRNA negatif, anormal sitolojili servikal örneklerin genotiplendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):86-8.

Sayın Editör,

Servikal karsinom, başlıca jinekolojik malignansilerdendir ve insan papillomavirüslerinin (HPV) bu karsinomun etiolojisinde yer aldığı bilinmektedir. İnvazif serviks kanseri olan hastaların HPV ile enfekte olduğu bildirilmektedir. Başlıca olarak, HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 ve 58 gibi tipler servikal karsinom ile ilişkilidir^(1,2). Özellikle L1 proteininin DNA ve aminoasit dizileri, HPV tipleri arasında oldukça korunmuştur. HPV genotiplerinin tanımlanmasında PCR temelli çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Herbir genotip tipe-özümlü PCR primer setleri ile saptanabilmektedir⁽³⁾. Kansere yol açan E6 veya E7 gen bölgelerini hedefleyen PCR yöntemleri ise, farklı HPV tipleri arasındaki nükleotid dizilerindeki en büyük farklılıklara sahip olduğu ve enfekte hücreler tarafından her zaman korunduğu için önemlidir. En büyük dezavantaj, viral genomun konak hücre genomuna tamamen entegre bir biçimde olması halinde, bunun potansiyelinin bulunmamasıdır. Dolayısıyla, PCR için hedef, E6 ve E7 dışındaki bölgeler için mevcut olmayabilmektedir. Diğer yandan, E6 ve E7 gen bölgelerini hedeflemek; ilgili primerler kullanıldığı takdirde, yüksek-riskli HPV tipleri ile olan tüm örnekleri saptayabilmektedir^(4,5).

Bu çalışmada, daha önceki çalışmamızda HPV DNA pozitif ve mRNA negatif bulunan örneklerin; HPV tanısında yaygın olarak kullanılan L1 ve E6/E7 bölgelerini hedefleyen farklı primer setleri kullanılarak, en sık karşılaşılan HPV genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Alındığı tarih / Received:
15.09.2020 / 15.July.2020

Kabul tarihi / Accepted:
03.01.2021 / 03.January.2021

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

A. Altay Koçak 0000-0002-0451-0142
İ. Tüney 0000-0002-2850-2171
K. Ergünay 0000-0001-5422-1982
A. Usubütün 0000-0001-9572-7875
K. Yüce 0000-0001-7768-8278
I. Görzer 0000-0003-1936-0404
E. P. Stöckl 0000-0002-0673-8335
G. Bozdayı 0000-0002-6036-6819

✉ aylnalty@hotmail.com

* Bu çalışma XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY)

Önceki çalışmamızda HPV mRNA ve DNA varlığı değerlendirilen anormal sitolojili servikal sürüntü örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları Doğum Polikliniğine 2011 Ocak-Ekim arasında başvurmuş hastalardan toplanmıştır. HPV DNA ve E6/E7 mRNA saptanması için, Real-time PCR (Heliosis HPV LC PCR Kit, Metis Biyoteknoloji, Türkiye) ve NASBA yöntemi (NucliSENS EasyQ HPV v1.1, bioMerieux, France) kullanılmıştır. HPV DNA saptamak için kullanılan yöntem 'HPV-16 veya HPV-16 dışı pozitif' şeklinde sonuç verirken, NASBA yöntemi ise HPV-16, 18, 31, 33 ve 45 tiplerindeki mRNA pozitifliklerini saptamaktadır. HPV-18, 31, 33, 35, 39 ve 45'in genotiplendirilmesi için L1 gen bölgesini hedefleyen tipe özgü 'PGMY' primerleri⁽⁶⁾ (Metis Biyoteknoloji, Türkiye); E6/E7 geninin saptanması için E6/E7 ortak primerleri⁷ (Heliks Biotechnology, Türkiye) ile standart PCR yöntemi (PCR mastermix, Promega, ABD) kullanılmıştır. Primer dizileri, BioEdit 3.0 programında HPV referans suşları ile karşılaştırılarak kontrol edilmiştir. Sonuçların confirmasyonu ise, 'LineProbe' yöntemi (INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp, Innogenetics, Belgium) ile yapılmıştır.

Önceki çalışma grubu, 81 anormal sitolojili kadın hastadan oluşmaktadır. Örneklerin 73'ünde (%90.1) HPV DNA saptanmış ve bunların 46'sını (%63.1) HPV-16, 15'ini (%20.5) HPV-16 dışı tipler ve 12'sini (%16.4) miks tipler oluşturmuştur. E6/E7 mRNA ekspresyonu ise 45 (%55.6) örnekte gözlenmiştir. 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. HPV E6/E7 ortak primerleriyle, 43 örneğin 5'i (%12) pozitif bulunmuştur. Bunların 4'ü HPV-16 genotipine, 1'i ise tip-16 dışı pozitifliğe sahiptir. Genotiplendirme için ise, tip 18, 31, 33, 39 ve 45'e ait pozitif kontroller ile PCR optimizasyonları yapılmış ve tip 33 dışındakiler optimize edilerek pozitif kontrolleri iyi çalışmıştır. Tip 33'ün ise, pozitif kontrolü çalışmamış ve L1 bölgesini hedefleyen yeni bir primer (TIB MOLBIOL, Berlin, Almanya) tasarlanmıştır. Ancak çeşitli PCR koşullarında denenmesine

rağmen optimize edilememiş ve tip 33 çalışma dışı bırakılmıştır. Bunun yanında, 43 örneğin hepsi genotip 18, 31, 39 ve 45 için 'in house PCR' ile negatif bulunmuştur. Bu nedenle, LiPA ile 12 örneğin doğrulama testi yapılmış ve 8'inde tip 6, 11, 16, 43, 53, 62, 81, 89 pozitif bulunmuştur. Bu tipler, standart PCR ile çalıştığımız genotiplerin dışındadır. Kalan 4 örneğin ise; ikisinde tip 33, diğer ikisinde tip 39 saptanmıştır. Ancak bu 4 örneğin hiçbirinde bu genotipler, standart PCR yöntemi ile saptanamamıştır. Sınırlı miktardaki örnek hacmi nedeni ile de tüm örnekler LiPA ile çalışılmamıştır.

LiPA bulgularına göre, örneklerin bir kısmı HPV 18, 31, 39 ve 45 genotiplerinden farklı olduğu için standart PCR ile negatif bulunmuştur. Bunun yanında, LiPA'nın 65 baz çiftlik bir bölgeyi çoğaltması nedeniyle, 238 ve 455 baz çiftlik bölgeleri çoğaltan 'in house PCR' yöntemlerimizden daha duyarlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle, bazı pozitif tipler saptanamamış olabilir. Ayrıca, E6/E7 gen bölgeleri, L1 bölgesi kadar korunmuş olmadığı için, daha çok negatif sonuç almak olasıdır. Konak hücre genomuna entegrasyon, çoğunlukla E2 ve E1'in, ayrıca L1 ve L2'nin de dahil olduğu büyük bölgelerin kaybına yol açmaktadır ve entegre HPV DNA'nın kalan kısımları, enfekte olmuş bir hücrede mevcut olan tek formu olabilmektedir. Bu da, silinen herhangi bir bölgeye yönelik primerler içeren PCR yaklaşımları için ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Diğer bir konu da HPV DNA mutasyonlarının, genomun L1 bölgesinde E6 bölgesinden daha sık gerçekleştiğidir. Bu, PCR primerlerinin hibridizasyona uygunluğunu ve dolayısıyla mevcut HPV'yi saptama yeteneğini etkileyebilmektedir⁴. Sonuç olarak, çalışmamızdaki HPV mRNA negatif-DNA pozitif örneklerin tipleri belirlenmeye çalışılmış ve mRNA negatifliğine yol açan etkenler araştırılarak değerlendirilmiştir. Buna göre; LiPA yöntemi ile genotiplendirilebilen örneklerin tiplerinin, HPV mRNA yönteminde taranan genotiplerden farklı olması nedeniyle mRNA pozitifliklerinin yakalanamadığı saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Buttmann-Schweiger N, Deleré Y, Klug SJ, Kraywinkel K. Cancer incidence in Germany attributable to human papillomavirus in 2013. *BMC Cancer*. 2017;17(1):682. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3678-6>
2. Li P, Tan Y, Zhu L, et al. Prognostic value of HPV DNA status in cervical cancer before treatment: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(39): 66352-9. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18558>
3. Tsakogiannis D, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. *Expert Rev Mol Med*. 2017;19:e1. <https://doi.org/10.1017/erm.2017.2>
4. Morris BJ. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1171-7. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2005.20>
5. Lagheden C, Eklund C, Lamin H, et al. Nationwide comprehensive human papillomavirus (HPV) genotyping of invasive cervical cancer. *Br J Cancer*. 2018;118(10):1377-81. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0053-6>
6. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357-61.
7. Hwang T. Detection and typing of human papillomavirus DNA by PCR using consensus primers in various cervical lesions of Korean woman. *J Korean Med Sci*. 1999;14(6):593-9. <https://doi.org/10.3346/jk>