

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN PAPİLLOMA VİRÜSÜNÜN SAPTANMASINDA
LABORATUVAR YAPIMI LAMP YÖNTEMİNİN ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Onur TAŞCI

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN PAPİLLOMA VİRÜSÜNÜN SAPTANMASINDA
LABORATUVAR YAPIMI LAMP YÖNTEMİNİN ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Onur TAŞÇI

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Alpaslan ALP

ANKARA

2024

TEŞEKKÜR

Geleceğe hizmet edebilmek ümidiyle başladığım, yoğun emek ve özveri gerektiren bir süreci tamamlamanın mutluluğunu ve gururunu yaşıyorum. Bu süreçte desteğini esirgemeyerek çalışmanın tamamlanmasında katkısı olan tüm kişi ve kurumlara minnettarım.

Öncelikle, birlikte çalışma fırsatı bulduğum için kendimi oldukça şanslı hissettiğim, bilgi ve tecrübesi ile bana her aşamada destek olup rehberlik eden, çalışma sürecini daha verimli ve keyifli hale getiren, profesyonelliği ve nezaketiyle bana her zaman ilham olan, çok değerli hocam Prof. Dr. Alpaslan Alp'e,

Çalışma boyunca desteklerini sunan, varlığını daima yanımda hissettiğim Prof. Dr. Murat Gültekin'e,

Uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Birlikte öğrenip, yan yana çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm uzmanlık eğitimi arkadaşlarıma,

Laboratuvardaki işlerime destek verip elimden tutan ve Lab. Tek. Gülçin Macit ve Lab. Tek. Gülten Nur Sarı'ya,

Her an hayat ve neşe kaynağım olan biricik eşim Elif Taşçı'ya, sevgi ve destekleri ile daima arkamda duran saygı değer babam Hasan Taşçı, annem Nejla Taşçı ve ablam Gamze Taşçı Abacılı'ya,

THD-2023-20805 numaralı bu projeye destek veren Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Taşçı O, İnsan Papilloma Virüsünün Saptanmasında Laboratuvar Yapımı LAMP Yönteminin Etkinliğinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2024.

İnsan Papilloma Virüsleri (Human papilloma virüs: HPV) insanlarda cilt ve mukoza enfeksiyonlarına sebep olan DNA virüsleridir. HPV enfeksiyonu, en sık görülen cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar arasında birinci sıradadır. Günümüzde 200’den fazla HPV tipi tanımlanmıştır ve yüksek riskli (high risk: HR) tipler olarak bilinen onkojenik HPV tiplerinin neden olduğu kalıcı enfeksiyon, kanser öncülü lezyonlara ve kansere neden olabilmektedir. Bunlar arasında da HPV 16 ve HPV 18 tipleri en yüksek karsinojenik potansiyele sahip olanlardır. HR HPV tiplerinin neden olduğu kanserler arasında serviks kanseri ilk sırada gelmektedir ve serviks kanseri olgularının çoğunluğu HPV 16 ve HPV 18 enfeksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Uygun aşılama ve tarama programları sayesinde serviks kanseri gelişmesine engel olunabilmektedir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında servikal sürüntülerden HPV DNA varlığının araştırılması ve HPV genotiplemesi amacıyla PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli testler kullanılmaktadır. PZR için termal döngü cihazı gibi özel bir ekipman, önemli miktarda zaman ve eğitimli personel gerekmektedir. Bu gerekliliklerinden ötürü, PZR testlerine ulaşabilen birey sayısı sınırlıdır. PZR’nin bilinen zorluklarına çözüm olması amacıyla Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification: LAMP) olarak bilinen yöntem geliştirilmiştir. LAMP yöntemi ile kompleks laboratuvar cihazlarına ihtiyaç duyulmadan, 60-65°C sabit sıcaklıkta ve kısa bir sürede DNA amplifikasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Bu çalışmada, serviks kanseri olgularının büyük çoğunluğundan sorumlu olan HPV 16 ve HPV 18 genotiplerinin klinik örneklerden saptanmasında LAMP yönteminin etkinliğini değerlendirmek amaçlanmıştır. Bir yıl boyunca moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında PZR testi sonuçlandırılan örnekler içerisinde HPV 16 ve HPV 18 pozitif olanlar ileriye dönük olarak toplanmıştır. Toplamda 288 adet servikal sürüntü örneğinden 259 adet HPV 16 ve 29 adet HPV 18 elde edilmiştir. LAMP için primer tasarlanması ve LAMP optimizasyonu yapıldıktan sonra tüm izolatlar LAMP deneylerine dahil edilmiştir. LAMP yönteminin HPV 16 ve HPV 18 saptamadaki

performansını değerlendirmek için PZR sonuçları referans alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre LAMP yönteminin HPV 16 için duyarlılığı %97 ve özgüllüğü %100 olarak saptanırken, HPV 18 için ise duyarlılık %86 ve özgüllük %91 olarak saptanmıştır. LAMP yönteminin tespit edebileceği minimum virüs miktarının HPV 16 ve HPV 18 genotiplerinin her ikisi için de 10 IU/mL olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, LAMP yöntemi ile servikal sürüntülerden DNA izolasyonu yapılmadan da HPV 16 ve HPV 18 saptamanın mümkün olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra LAMP reaksiyon ürünlerinin tespitinde Sybr Green boyası veya yanak akış şeridi kullanarak görsel sonuç almanın mümkün olduğu görülmüştür. Sonuç olarak; LAMP yönteminin HPV 16 ve HPV 18 saptanması için laboratuvar da veya hasta başı test uygulamasında faydalı bir yöntem olabileceği düşünülmüştür. Örnek sayısı ve çeşitliliği artırılarak, yöntemin performansını geliştirici çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İnsan Papilloma Virüsü (Human papilloma virüs: HPV), HPV 16, HPV 18, LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification), gerçek zamanlı PZR, laboratuvar yapımı test, serviks kanseri.

Destekleyen kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi, Proje No: THD-2023-20805.

ABSTRACT

Tasci O, Evaluation of the Efficacy of Laboratory Made LAMP Method in Detection of Human Papilloma Virus, Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Thesis In Medical Microbiology, Ankara, 2024. Human Papillomaviruses (HPV) are DNA viruses that cause skin and mucous membrane infections in humans. HPV infection ranks first among the most common sexually transmitted infections. Today, more than 200 HPV types have been identified and persistent infection caused by oncogenic HPV types known as high risk (HR) types can cause precancerous lesions and cancer. Among these, HPV 16 and HPV 18 types have the highest carcinogenic potential. Cervical cancer ranks first among cancers caused by HR HPV types and the majority of cervical cancer cases are caused by HPV 16 and HPV 18 infections. Appropriate vaccination and screening programmes can prevent the development of cervical cancer. In clinical microbiology laboratories, PCR (Polymerase Chain Reaction) based tests are used to investigate the presence of HPV DNA in cervical swabs and for HPV genotyping. PCR requires specialised equipment such as a thermal cycler, a significant amount of time and trained personnel. Due to these requirements, the number of individuals who can access PCR tests is limited. As a solution to the known difficulties of PCR, a method known as Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) has been developed. With the LAMP method, DNA amplification can be performed at a constant temperature of 60-65°C and in a short time without the need for complex laboratory equipment. In this study, we aimed to evaluate the efficiency of the LAMP method in the detection of HPV 16 and HPV 18 genotypes, which are responsible for the majority of cervical cancer cases, in clinical samples. Among the samples whose PCR tests were completed in the molecular microbiology laboratory for a year, HPV 16 and HPV 18 positive samples were collected prospectively. In total, 259 HPV 16 and 29 HPV 18 were obtained from 288 cervical swab samples. After primer design for LAMP and LAMP optimisation, all isolates were included in LAMP experiments. PCR results were taken as reference to evaluate the performance of LAMP method in HPV 16 and HPV 18 detection. According to the results obtained, the sensitivity and specificity of the LAMP method for HPV 16 were 97% and 100%, respectively, while the sensitivity and specificity for

HPV 18 were 86% and 91%, respectively. The minimum amount of virus detected by the LAMP method was found to be 10 IU/mL for both HPV 16 and HPV 18 genotypes. The study showed that it was possible to detect HPV 16 and HPV 18 by LAMP method without DNA isolation from cervical swabs. It was observed that it was possible to obtain visual results by using Sybr Green stain or lateral flow strip in the detection of LAMP reaction products. As a result, it was concluded that the LAMP method can be a useful method for the detection of HPV 16 and HPV 18 in the laboratory or in bedside testing. It was concluded that studies are needed to improve the performance of the method by increasing the number and variety of samples.

Keywords: Human papilloma virus (HPV), HPV 16, HPV 18, LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification), real-time PCR, laboratory made test, cervical cancer.

Supporting organization: Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit, Project No: THD-2023-20805.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnsan Papilloma Virüsü	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Virüsün Sınıflandırılması	6
2.1.3. Virüsün Genom ve Replikasyon Özellikleri.....	8
2.1.4. Bulaş ve Epidemiyoloji	11
2.1.5. Patogenez ve İmmünite	14
2.2. İnsan Papilloma Virüs Hastalıkları ve Klinik Bulgular.....	16
2.3. İnsan Papilloma Virüs Laboratuvar Tanısı	19
2.3.1. Sitolojik ve Histolojik İnceleme.....	20
2.3.2. Moleküler Yöntemler	21
2.4. LAMP Yöntemi	24
2.4.1. LAMP Çalışma Prensipleri.....	25
2.4.2. LAMP Amplifikasyon Ürünlerinin Tespiti.....	29
2.4.3. LAMP Yönteminin Avantajları ve Kısıtlamaları.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Örneklerin Toplanması	34
3.2. Viral DNA İzolasyonu	35
3.3. Primerlerin Tasarlanması.....	35
3.4. LAMP Reaksiyonlarının Optimizasyonu	37
3.5. LAMP Reaksiyon Ürünlerinin Tespiti.....	38
3.5.1. Gerçek Zamanlı PZR Cihazı ile Tespit.....	39
3.5.2. Yanal Akış Şeridi ile Tespit	40

3.5.3. Sybr Green Boyası ile Tespit	40
3.6. LAMP Yöntemiyle Tespit Edilebilecek Minimum Virüs Miktarı	41
3.7. Direkt Klinik Örnek Kullanımı	42
3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi	42
4. BULGULAR.....	45
4.1. HPV 16 ve 18 Tespitinde LAMP Yönteminin Etkinliğinin Değerlendirilmesi	45
4.1.1. HPV 16 Tespitinde LAMP Yönteminin Etkinliği.....	45
4.1.2. HPV 18 Tespitinde LAMP Yönteminin Etkinliği.....	46
4.2. LAMP Yönteminin Tespit Edebileceği Minimum Virüs Miktarı.....	47
4.3. Reaksiyon Ürünlerinin Tespitinde Görsel Yöntemlerin Kullanımı	48
4.3.1. Reaksiyon Ürünlerinin Yanal Akış Şeridi ile Tespiti	48
4.3.2. Reaksiyon Ürünlerinin Sybr Green Boyası ile Tespiti	49
4.4. LAMP Yönteminin Klinik Örneğe Doğrudan Uygulanması.....	50
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
7. KAYNAKLAR.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
AGC	Atipik glandüler hücreler
AIN	Anal intraepitelyal neoplazi
AIS	Endoservikal adenokarsinom
ASC	Atipik skuamöz hücreler
ATP	Adenozin trifosfat
BGD	Biyogüvenlik düzeyi
BIP	Geri iç primer
BLAST	Temel Yerel Uyum Arama Aracı
BLP	Geri döngü primeri
CIN	Servikal intraepitelyal neoplazi
CTP	Sitozin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleik asitler
dsDNA	Çift iplikli Deoksiribonükleik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EXPAR	Üstel amplifikasyon reaksiyonu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FIP	İleri iç primer
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FLP	İleri döngü primeri
GTP	Guanin trifosfat
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
HR	Yüksek risk
HSIL	Yüksek derece skuamöz intraepitelyal lezyon
HSPG	Heparin sülfat proteoglikan
HSV	Herpes Simpleks Virüs
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi
IgG	İmmün globülin G
IU	Uluslararası birim

LAMP	Döngü aracılı izotermal amplifikasyon
LCR	Uzun kontrol bölgesi
LR	Düşük risk
LSIL	Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar
Mg	Magnezyum
MgSO4	Magnezyum sülyat
mL	Mililitre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NASBA	Nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon
NCR	Kodlamayan bölge
nm	Nanometre
NPD	Negatif prediktif değer
ORF	Açık okuma çerçevesi
PIN	Penil intraepitelyal neoplazi
PPD	Pozitif prediktif değer
PV	Papilloma virüs
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RPA	Rekombinaz polimeraz amplifikasyonu
RT	Ters transkripsiyon
SDA	İplik yer değiştirme amplifikasyonu
Tm	Erime sıcaklığı
TTP	Timin trifosfat
URR	Upstream regülatör bölge
UV	Ultraviyole
VaIN	Vulvar intraepitelyal neoplazi
VIN	Vajinal intraepitelyal neoplazi
VLP	Virüs benzeri partiküller
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
µL	Mikrolitre
µM	Mikrometre

ŞEKİLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. PV'lerin L1 dizisine dayalı filogenetik ağacı.....	6
Şekil 2.2. HPV'lerin L1 dizisine dayalı filogenetik ağacı.....	7
Şekil 2.3. HPV genomunun şematik görünümü	8
Şekil 2.4. HPV yaşam döngüsü	10
Şekil 2.5. HPV'nin dünya bölgelerinde yaşa göre dağılımı	13
Şekil 2.6. LAMP reaksiyonunda kullanılan primerler.....	26
Şekil 2.7. LAMP reaksiyon basamaklarının dambıl şekilli DNA oluşumuna kadar şematik gösterimi.....	27
Şekil 2.8. Dambıl şekilli DNA oluşumundan sonraki LAMP reaksiyonlarının şematik gösterimi	28
Şekil 2.9. LAMP ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.	30
Şekil 2.10. LAMP ürünlerinin tespitinde kullanılan boyalar ve renk değişimleri.	31
Şekil 3.1. Gerçek zamanlı PZR cihazından elde edilen görsellerin yorumu	40
Şekil 4.1. LAMP reaksiyon ürünlerinin yanak akış şeridinde tespiti	49
Şekil 4.2. Reaksiyon sonunda Sybr Green eklenmesiyle gözlenen renk değişikliği (solda) ve UV altında floresan ışıma (sağda)	50

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. HPV tarafından ifade edilen proteinlerin ana rolleri	9
Tablo 2.2. HPV ilişkili hastalıklar ve sebep olan HPV türleri	17
Tablo 3.1. LAMP primerlerinin hedef bölgeleri ve dizileri	36
Tablo 3.2. Stok primer solüsyonlarının ikinci dilüsyon sonucu konsantrasyonları	37
Tablo 3.3. LAMP reaksiyon içerikleri, reaksiyonda son konsantrasyon ve hacimleri	38
Tablo 4.1. Referans teste göre HPV 16 için LAMP testi sonuçlarının dağılımı	46
Tablo 4.2. HPV 16 için LAMP tanı testinin analiz sonuçları	46
Tablo 4.3. Referans teste göre HPV 18 için LAMP testi sonuçlarının dağılımı	47
Tablo 4.4. HPV 18 için LAMP tanı testinin analiz sonuçları	47

1. GİRİŞ

İnsan papilloma virüsleri (Human papilloma virüs: HPV) insanlarda çeşitli enfeksiyonlara sebep olmasıyla bilinen *Papillomaviridae* içerisinde sınıflandırılan DNA virüsleridir. Yeni üyeleri keşfedilmeye devam etmekte olan geniş bir virüs grubunu oluşturmaktadırlar (1). Günümüzde 200'den fazla farklı HPV tipi tanımlanmıştır ve iyi huylu cilt lezyonlarından, serviks, vulva, orofarenks, anüs ve penis malignitelerine kadar geniş bir hastalık grubuyla ilişkilidirler (2). HPV enfeksiyonu, en sık görülen cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar arasında birinci sıradadır ve esas olarak ciltten cilde veya mukozaya temas yolu ile bulaşır. Cinsel yolla bulaş en çok belgelenmiş bulaş yolu olmakla birlikte, cinsel yolla olmayan bulaş çeşitlerini (horizontal yolla geçiş, kendi kendine inokülasyon, anneden bebeğe vertikal geçiş) gösteren çalışmalar da mevcuttur (3).

HPV enfeksiyonlarının birçoğu herhangi bir semptomla neden olmadan kendiliğinden iyileşir. Ancak yüksek riskli (high risk: HR) tipler olarak bilinen onkogenik HPV tiplerinin neden olduğu kalıcı enfeksiyon, kanser öncülü lezyonlara ve kansere neden olabilir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı son raporunda 12 HPV tipini (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) insanlar için kanserojen olarak tanımlamıştır (4). Bunlar arasında da HPV16 ve HPV18 tipleri en yüksek karsinojenik potansiyele sahip olanlardır (5). HR HPV tiplerinin neden olduğu kanserler arasında serviks kanseri ilk sırada gelmektedir ve serviks kanseri olgularının da neredeyse tamamı HR HPV kaynaklıdır (6). Serviks kanseri ise dünya genelinde kadınlar arasında görülen en yaygın 4. kanserdir ve her yıl 300.000'den fazla ölüme sebep olmaktadır (7).

HPV enfeksiyonunu önleyen aşılarda geliştirilmesiyle Dünya Sağlık Örgütü (WHO) HPV ilişkili kanserlerin engellenmesini bir öncelik olarak belirlemiştir. Önerilen aşı programı uygulanan ülkelerde zaman içinde HPV prevalansında azalma meydana gelmiştir (8). Günümüzde servikal HPV enfeksiyonuna bağlı gelişen kanserlerin ve ölümlerin coğrafi dağılımı homojen değildir. Serviks kanserlerinin yaklaşık %90'ı organize bir tarama ve aşı programı olmayan Afrika, Asya ve Güney Amerika'daki düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmektedir (8). Ülkemizde HPV

aşıları rutin aşılama programı içerisinde bulunmamaktadır, ancak 2004 yılından itibaren yaygın olarak kullanılan tarama programları sayesinde servikal kanser insidansında bir azalma sağlanmıştır (9).

Serviks kanseri taraması, hastalığın preinvaziv evresinin uzun olmasından ötürü serviks bölgesinden toplanan örneklerin sitolojik incelemesi ile yapılmaktadır. Yapılan servikal sitolojik inceleme sonucunda serviks epitelindeki erken değişiklikler, kanser öncesi evrede saptanabilmektedir (10). ‘Pap (Papanicolaou) smear’ testi bu amaçla uygulamaya giren ilk test olmakla birlikte bir diğer alternatifi ise sıvı bazlı sitolojidir. Sıvı bazlı sitolojinin ‘Pap smear’ testine üstünlüğü ise kullanılan materyalin daha sonrasında HR HPV varlığı araştırılmasında kullanılabilmesidir (11). ‘Pap smear’ testi beraberinde HR HPV varlığının araştırılması serviks kanserinin erken teşhisinde duyarlılığı arttırmaktadır (12).

Serviks kanseri gelişiminde HR HPV enfeksiyonunu takiben 5 ile 10 yıllık bir süre bulunmaktadır. Serviks kanseri taramasında kullanılan HPV bazlı yöntemler, hastalarda morfolojik değişiklikler olmasından bağımsız, inatçı enfeksiyonu olanlarda serviks kanserinin önlenmesi için bir fırsat sunmaktadır (13). Ülkemizde, taranması gereken kadınların ‘Pap smear’ testine katılım için genelde isteksizliği ve yetersiz laboratuvar sitopatoloji kapasitesi gibi lojistik nedenlerden ötürü HPV bazlı tarama testleri daha da önemli hale gelmektedir (14, 15). Ülkemizde 2004 yılından itibaren uygulanan tarama programına 2014 yılında HPV DNA varlığını araştıran testlerin girmesiyle çok daha geniş bir topluluğa ulaşılmış ve serviks kanseri ile mücadelede önemli ilerleme kaydedilmiştir (16).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında HPV DNA varlığının araştırılması ve HPV genotiplemesi amacıyla PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli testler kullanılmaktadır. PZR'nin tüm çeşitleri DNA'nın denatürasyonunu, primerlerin tamamlayıcı DNA bazlarına hibridizasyonunu ve DNA zincirinin özgül uzamasını içeren, kesin olarak belirlenmiş süreler ve sıcaklık koşulları gerektirir (17). Toplamda 35-40 adet birbirinin aynı döngü sayesinde başlangıçtaki DNA sayısı katlanarak artar. Bu işlem, termal döngü cihazı gibi özel bir ekipman ve önemli miktarda zaman gerektirir.

PZR'nin bilinen zorluklarına çözüm olması amacıyla Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification: LAMP) olarak bilinen yöntem geliştirilmiştir (18). LAMP yöntemi sayesinde termal döngü cihazı gibi kompleks laboratuvar cihazlarına ihtiyaç duymadan, kuru blok ısıtıcı veya su banyosu gibi daha basit ekipmanlar yardımıyla 60-65°C sabit sıcaklıkta DNA amplifikasyonu gerçekleştirilebilmektedir. LAMP yöntemi kullanılarak PZR ile elde edilen bir milyon kopyaya kıyasla, çoğaltılmış DNA miktarı bir saatten az sürede yaklaşık bir milyar kopyaya kadar arttırılabilmektedir (19). LAMP yönteminin bir diğer yenilikçi yanı ise PZR'de kullanılan 2 primer yerine 4-6 adet primer kullanılmasından kaynaklanan yüksek analitik özgüllüğüdür (19).

HR HPV enfeksiyonları kaynaklı serviks kanserinin dünya genelinde yaygınlığı, özellikle orta ve düşük gelirli ülkelerde halen kadınların önemli bir ölüm sebebi olması, alternatif tarama ve tanı yöntemlerinin geliştirilmesi için itici güç olmaktadır. Serviks kanserinin daha fazla görüldüğü ülkeler düşünüldüğünde tarama testlerinin daha çok insana daha az nitelikli iş gücü ve uygun maliyetle ulaşabilmesi gerekmektedir. LAMP yönteminin doğasından kaynaklanan özellikleri ile uygun maliyetle, kısa sürede özgül sonuçlar alınabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, ülkemizde serviks kanseri olgularının büyük çoğunluğundan sorumlu iki HR HPV tipi olan HPV 16 ve HPV 18 tiplerinin klinik örneklerden saptanmasında LAMP yönteminin etkinliğini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan Papilloma Virüsü

2.1.1. Tarihçe

19. yüzyıla kadar genital siğiller genellikle frengi ya da gonoreenin bir formu olarak düşünülmekteydi. İnsan siğillerinin bulaşıcı ve viral doğası, 1900'lerin başında lezyonlardan alınan hücresiz filtratların intradermal inokülasyonu sonucu hastalığı bulaştırdığı gösterildiğinde ortaya konmuştur (20). 1930'lu yıllara gelindiğinde, pamuk kuyruklu ve evcil tavşanlarda tavşan papilloma virüslerinin karsinojenik potansiyelini araştıran çalışmalar yapılmış olsa da, insan siğil virüslerine ilgi düşük kalmıştır (21).

1970'li yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmeler ışığında HPV ailesinin çeşitliliğine dair bilgiler artmıştır. Plantar siğil virüsü preparatlarının intratipik heterojenliğini ve farklı izolatların tipe özgü endonükleaz kısıtlama modellerini inceleyen çalışmalar, HPV tiplerinin çeşitliliğini açıkça ortaya koymuştur (22, 23). Genom dizileme sürecinin tamamlanması, HPV genomundaki Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame: ORF) bölgelerinin tanımlanması ve viral genomdaki genler hakkındaki bilginin artmasıyla HPV, viral onkogeneizde yeni bir model olarak kabul edilmiştir (21).

HPV enfeksiyonları ile serviks kanseri arasında ilişki kurmaya çalışan araştırmalar ilk olarak 1972'de başlamıştır. Bu çalışmalar, genital siğillerin skuamöz hücreli karsinomlara nadir malign dönüşümüne ilişkin tıbbi literatürdeki anekdotal raporlara dayanıyordu (24). O yıllarda serviks kanserinden sorumlu ajan olarak Herpes Simpleks Virüs (HSV) Tip 2'den de şüpheleniliyordu. HPV'nin sorumlu ajan olduğu fikri, serviks kanseri biyopsilerinde HSV Tip 2 DNA'sını göstermeye yönelik olumsuz girişimlerle de desteklenmiştir (25). 1977'de iki araştırmacı düz displastik lezyonları olan hastaların servikal yaymalarında bulunan koilositotik hücrelerin, HPV enfeksiyonunun sitopatojenik değişimini temsil ettiğini öne sürdüler. Bundan bir sene sonra koilositotik hücreler içinde tipik HPV partiküllerinin gösterilmesi, HPV aracılı sitopatik etkiyi doğrulamıştır (26).

1983 yılında, HPV 11'i prob olarak kullanarak, daha sonraları HPV 16 olarak isimlendirilecek yeni bir HPV DNA'sı doğrudan serviks kanseri biyopsilerinden izole edilmiştir (21). Kısa bir süre sonra aynı ekip serviks kanseri biyopsilerinin yanı sıra serviks kanserinden türetilmiş hücre hattında da HPV 18 DNA'sını başarıyla izole etmiştir. Aynı yıl içinde anogenital kanserlerin tipik öncü lezyonları olan Bowenoid papülozda ve 1 yıl sonra servikal intraepitelyal neoplazilerde (CIN) HPV 16 DNA'sını göstermek mümkün olmuştur (27).

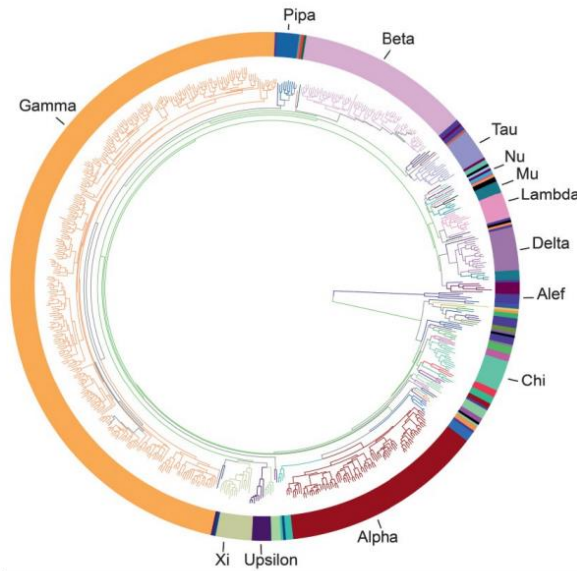
1985 yılının başlarında serviks kanserinde E6 (Erken 6) ve E7 (Erken 7) genlerinin seçici transkripsiyonu ve viral DNA'nın konak hücre DNA'sına entegrasyonu sırasında meydana gelen özgül delesyonlar tespit edilmiştir (21). Takip eden yıllarda E6 proteininin p53 ile etkileşime girerek bu proteinin bozulmasına yol açtığıının gösterilmesi ve E7 proteinin pRb ile etkileşime girerek pRb'nin işlevini bloke ettiğinin gösterilmesi viral onkogenezin anlaşılması için önemli aşamalar olmuştur (28, 29). Bu onkogenetik mekanizmaların açıklanması, immortalizasyona ve nihayetinde viral genom barındıran hücrelerin dönüştürülmüş bir fenotipine yol açan hücre içi olayların anlaşılması açısından önemliydi.

2006 yılına gelindiğinde, viral L1 (Geç 1) kapsid proteininin nötralize edici antikorları indükleyen virüs benzeri partiküller (VLP'ler) oluşturma yeteneğine dayanan profilaktik HPV alt birim aşıları geliştirilmiştir (30). Aynı yıl içerisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı alınarak aşı kullanıma sunulmuştur. Bugün HPV 16 ve 18'e karşı koruma sağlayan 2 valanlı, HPV 6, 11, 16, 18'e karşı koruma sağlayan 4 valanlı ve HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58'e karşı koruma sağlayan 9 valanlı olmak üzere üç tip aşı mevcuttur. Günümüzde HR HPV tiplerinin viral onkogeneiz mekanizmaları ile serviks kanseri arasındaki ilişki net olarak bilinmektedir. Birçok ülkede yaygın olarak uygulanan aşılama programları sayesinde serviks kanseri ile mücadelede önemli yol alınmıştır. Alman virolog Harold zur Hausen, HR HPV tipleri ile serviks kanseri arasındaki ilişkiyi kanıtlayan ve aşı gelişmelerinin önünü açan çalışmaları sebebiyle 2008 yılında Nobel Tıp ödülüne layık görülmüştür.

2.1.2. Virüsün Sınıflandırılması

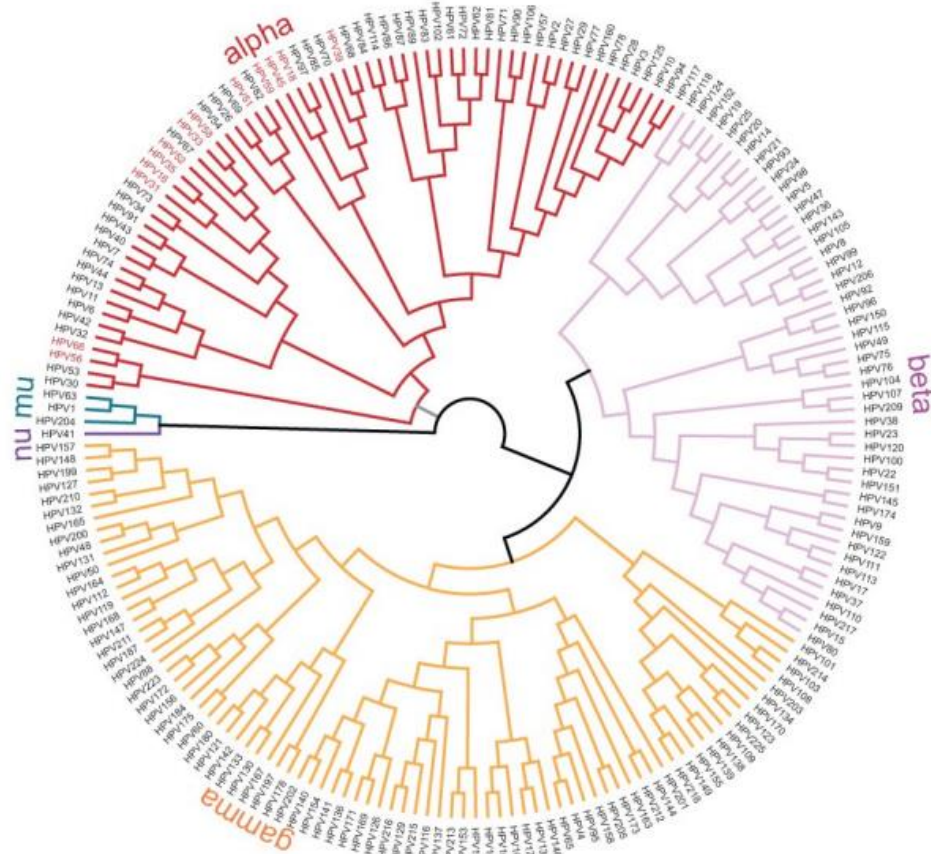
Papilloma virüsler (PV) *Papillomaviridae* içerisinde sınıflandırılan küçük, zarfsız, çift sarmallı DNA virüsleridir. PV genomları sürüngenlerden, kuşlardan, keseli hayvanlardan ve diğer birçok memeli türünden izole edilmiştir (31). Genellikle türe özgüdürler ve tercihen kutanöz veya mukokutanöz epiteli enfekte ederler. PV'ler enfekte ettikleri konakçı türlerine göre adlandırılır ve L1 geninin DNA dizilimine dayalı olarak bireysel türler olarak sınıflandırılır. Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) *Papillomaviridae* ailesini 50'den fazla cins ve 130 türe sahip *Firstpapillomavirinae* ve balık papilloma virüslerini içeren tek bir cinse sahip *Secondpapillomavirinae* olmak üzere iki alt aileye ayırmaktadır (20).

Papilloma virüsler, her biri Yunan alfabesinin bir harfiyle gösterilen 50'den fazla cinse ayrılmıştır (Şekil 2.1). Homoloji %60'tan fazla olduğunda iki HPV kökeni aynı cinse (α , β , γ , μ veya ν), %70'ten fazla homolojiye sahip olduklarında aynı cinse ve aynı türe ($\alpha 1$, $\alpha 2$..., $\beta 1$, $\beta 2$..., $\gamma 1$, $\gamma 2$..., vb.), %90 ile %98 arasında bir homolojiye sahip olduklarında aynı cinse, aynı türe ve aynı alt tipe ait olmaktadır. Homoloji farkının %2'den az olması farklı varyantlar olduğunu göstermektedir. (32).



Şekil 2.1. PV'lerin L1 dizisine dayalı filogenetik ağacı. ((20) numaralı kaynaktan aynen alınmıştır.)

İnsan Papilloma virüsleri insanlarda farklı kanser türlerine yol açabilmesi sebebiyle yoğun ilgi çekmiş ve detaylı analiz edilmiştir. Şu anda 200'den fazla HPV tipi tanımlanmış ve sınıflandırılmış durumdadır (2). HPV'ler 50'den fazla cinsin beşi arasında kümelenmiştir: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* ve *Nupapillomavirus* (Şekil 2.2). En büyük tıbbi öneme sahip HPV'ler, yani genital ve mukozal kanserler ile ilişkili olanlar, *Alphapapillomavirus* cinsinin üyeleridir. Çoğu *Alphapapillomavirus* tipi öncelikle genital ve genital olmayan mukozal yüzeyleri ve dış genital bölgeyi enfekte eder. Rahim ağzı kanserinde en sık rastlanan tip olan HPV 16, tür 9' un bir üyesiyken, kanserle ilişkili bir sonraki en yaygın tip olan HPV 18, tür 7' nin bir üyesidir. Kutanöz genital siğillerin çoğunun etkeni HPV 6 ise tür 10 üyesidir.

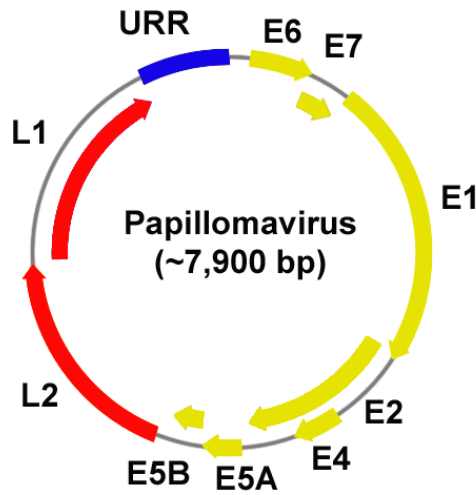


Şekil 2.2. HPV'lerin L1 dizisine dayalı filogenetik ağacı. ((20) numaralı kaynaktan aynen alınmıştır.)

2.1.3. Virüsün Genom ve Replikasyon Özellikleri

HPV'ler skuamöz epitel hücrelerinin çekirdeğinde çoğalan küçük, zarfsız, ikozahedral kapsitli DNA virüsleridir. HPV partiküllerinin çapı yaklaşık 60 nanometredir. Virion partikülleri, majör kapsid proteini olan L1 ve minör kapsid proteini olan L2 olmak üzere iki viral proteinden oluşan kapsid içinde bulunan, yaklaşık 8.000 baz çifti (bp) boyutunda tek bir çift iplikçikli dairesel DNA molekülünden oluşur (20).

Bugüne kadar 650'den fazla insan ve hayvan PV genomu bütünüyle dizilenmiş ve her birinin genel genomik organizasyonunun çok benzer olduğu görülmüştür (33). Her virüs, replikasyon orijinini, transkripsiyonel güçlendiricileri ve baskılayıcı unsurları ve promotörleri içeren yaklaşık bir kilobaz boyutunda bir düzenleyici bölge içerir. Bu bölge alternatif olarak yukarı akış düzenleyici bölge (URR), uzun kontrol bölgesi (LCR) veya kodlamayan bölge (NCR) olarak da adlandırılmıştır. Genomun geri kalanı erken (E) ve geç (L) kodlama bölgelerine ayrılmıştır (Şekil 2.3). Tüm viral Açık Okuma Çerçeve'leri (ORF'ler), transkripsiyon için şablon görevi gören tek bir iplikçik üzerinde bulunur (34).



Şekil 2.3. HPV genomunun şematik görünümü. Upstream regülatör bölge (upstream regulatory region; URR), şifre olmayan bölgedir. Açık okuma çerçeveleri (Open reading frames; ORFs), erken bölge (early; E) ve geç bölge (late; L) viral proteinleri şifreler. ((34) numaralı kaynaktan aynen alınmıştır.)

Genomdaki proteinler, virion yapısal proteinleri (L1 ve L2), viral genom transkripsiyonu ve replikasyonunun düzenleyicileri (E1 ve E2) ve konak hücrenin normal fizyolojisini virüsün üretken yaşam döngüsünü teşvik edecek şekilde bozan belirleyiciler (E4, E5, E6, E7) olarak işlev görür (2). Daha sonradan keşfedilen E3 ve E8 proteinleri de bulunmaktadır, ancak bu iki proteinin E2 bölgesinin delesyonu esnasında ortaya çıktığı düşünülmektedir (35). Özellikle HR HPV tiplerinin onkogeneiz mekanizmalarının anlaşılabilmesi için genomdaki bu proteinlerin işlevleri detaylı olarak araştırılmış ve ortaya çıkarılmıştır (Tablo 2.1). E6 ve E7 onkoproteinleri, pRb ve p53 tümör baskılayıcı proteinlerinin inaktivasyonu yoluyla, enfekte olan hücrelerin malign transformasyonuna önemli katkıda bulunur (36). Viral E6 ve E7 proteinlerinin artmış ekspresyonunun servikal neoplazinin başlaması ve ilerlemesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle E6 ve E7 mRNA transkriptlerinin saptanması, neoplaziye ilerleme riski artmış HPV enfeksiyonunun bir göstergesi olarak kullanılabilir (37).

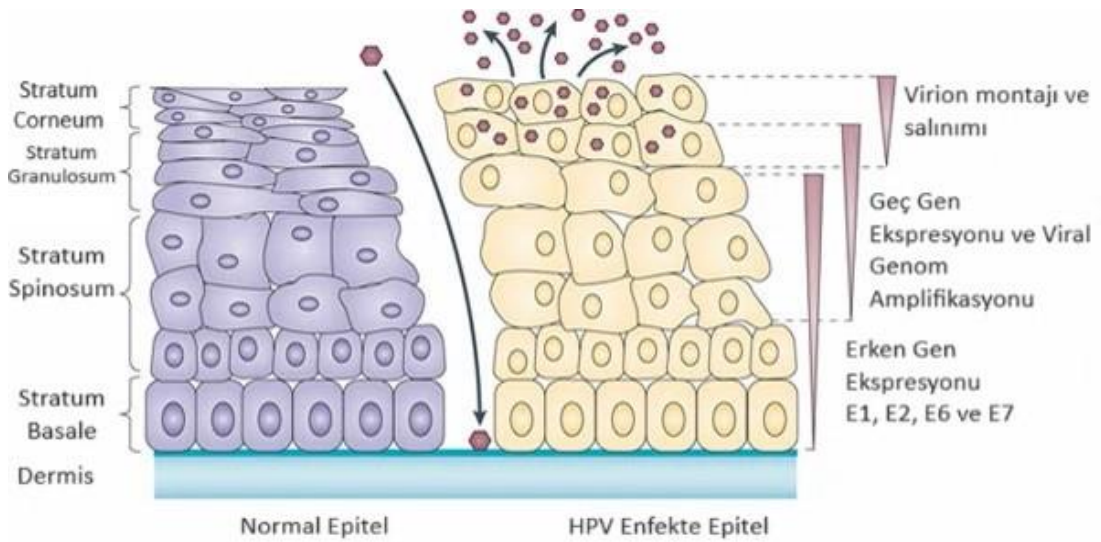
Tablo 2.1. HPV tarafından ifade edilen proteinlerin ana rolleri ((38) numaralı kaynaktan Türkçe 'ye çevrilmiştir.)

Protein	Virüs Yaşam Döngüsündeki Rol
E1	Genom replikasyonu: ATP'ye bağımlı DNA helikaz.
E2	Genom replikasyonu, transkripsiyon, segregasyon. Hücre gen ifadesinin düzenlenmesi. Hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesi.
E4	Sitokeratin ağını yeniden şekillendirir. Hücre döngüsünün durdurulması. Virion montajı.
E5	Hücre büyümesinin ve farklılaşmasının kontrolü. Bağışıklık modülasyonu.
E6	Onkoprotein. Apoptoz ve farklılaşmayı engeller. Hücre şekli, polaritesini, hareketliliğini ve sinyalleşmesini düzenler. p53 tümör baskılayıcı proteinin inaktivasyonu yoluyla, enfekte olan hücrelerin malign transformasyonuna önemli katkıda bulunur.
E7	Onkoprotein. Hücre döngüsü kontrolü. Sentrozom çoğalmasını kontrol eder. pRb tümör baskılayıcı proteinin inaktivasyonu yoluyla, enfekte olan hücrelerin malign transformasyonuna önemli katkıda bulunur.
L1	Majör kapsid proteini.
L2	Minör kapsid proteini.

Çoğu virüs bir hedef hücreyi enfekte eder ve aynı enfekte hücreden yeni nesil virüs üretir. Bunun tersine, HPV enfeksiyonlarında, yeni virionların sentezi ancak enfekte olmuş hücre mitoz geçirdikten ve enfekte olmuş yavru hücrelerden biri

farklılaştıktan sonra meydana gelir (39). HPV'ler skuamöz epitel hücreleri için yüksek tropizm gösterirler ve çok katlı skuamöz epitelin bazal tabakasındaki hücreleri enfekte ederler. Bu bazal hücreler, küçük mikro yaraların bir sonucu olarak açığa çıkar ve suprabazal katmanlardaki farklılaşmış hücreler hücre döngüsünden çıktığından, skuamöz epitelde sürekli hücre bölünmesi geçirebilen tek hücre grubudur. Dolayısıyla, virüsün uzun süreli ve kalıcı bir enfeksiyon oluşturabilmesi için bazal hücreleri enfekte etmesi gerekir. Geç gen ekspresyonu, kapsid proteinlerinin sentezi, vejetatif viral DNA sentezi ve virionların birleşmesi yalnızca terminal olarak farklılaşan yassı epitel hücrelerinde meydana gelir (40).

Viral genomlar, hücresel DNA replikasyonu ile senkronize olarak kopyalanır. Hücre bölünmesinden sonra bir yavru hücre bazal katmandan uzaklaşır ve farklılaşmaya uğrar (41). HPV pozitif hücrelerin farklılaşması, hücresel DNA sentez mekanizmasını gerektiren viral yaşam döngüsünün üretken aşamasını başlatır. E6 ve E7'nin ifadesi, hücre döngüsü kontrolünü serbest bırakır, farklılaşan hücreleri S fazına iter ve hücre döngüsünden çıkmış olan hücrelerde viral genom amplifikasyonuna izin verir (41). Geç faz L1 ve L2 proteinleri, yeni sentezlenen viral genomlar, kapsitler ve tam virionlar, epitelin en üst katmanlarından dökülür (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. HPV yaşam döngüsü. ((40) numaralı kaynaktan Türkçe'ye çevrilmiştir.)

2.1.4. Bulaş ve Epidemiyoloji

HPV esas olarak ciltten cilde veya ciltten mukozaya temas yoluyla bulaşır. Cinsel yolla bulaş en çok belgelenmiş olanıdır ancak cinsel olmayan yolları öne süren çalışmalar da mevcuttur. HPV bulaşında birincil yolun cinsel ilişki olduğunu gösteren çalışmalara; genital siğillerin partnerler arasında bulaşını gösteren, HPV varyantına özgü veya tipe özgü HPV DNA'lar arasında partnerler arasında uyumu gösteren, vajinal ilişki yaşamayan kadınlarda HPV enfeksiyonunun nadirliğini gösteren, kadınlarda ve erkeklerde yaşam boyu cinsel partner sayısı ile HPV prevalansı arasındaki güçlü ve tutarlı ilişkiyi gösteren çalışmalar örnek olarak verilebilir (42-44).

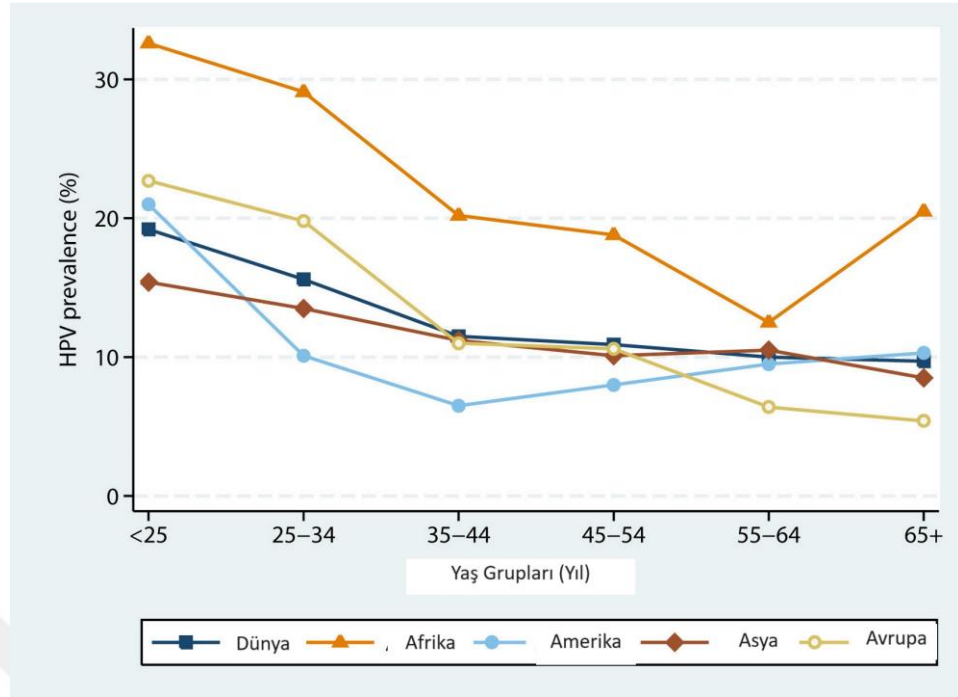
Diğer bulaşma yollarına değinmeden önce söylenmesi gereken esaslardan biri, HPV'lerin dayanıklı virüsler olduğudur. HPV'ler yüzeylerde, giysilerde, sıklıkla kullanılan jinekolojik ekipmanlarda ve fomitlerde günlerce enfektif kalma eğilimindedir (45). HPV'lerin kuruluğa ve dezenfektanlara karşı direncini gösteren çalışmalar, anneden bebeğe geçiş haricinde kalan, cinsel olmayan yollarla yayılma fikrinin temelini oluşturur. HPV'nin yatay (horizontal) bulaşı parmakları, diş etlerini, ağzı ve cinsel olmayan cilt temasını içerir. Bu olası yolların tartışıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur (3). İlgi çekici birkaç çalışmada jinekolojik muayene odalarında kullanılan spekulum, transvajinal ultrason probları, eldiven gibi fomitlerde HPV DNA varlığı gösterilmiş ve horizontal bulaşa kaynak olabileceği söylenmiştir (46).

Cinsel olmayan bulaş yollarından en çok üzerinde durulanlardan bir diğeri anneden bebeğe vertikal geçiştir. Birçok çalışmada amniyon sıvısı, plasenta veya normal doğum esnasında annenin genital mukozasıyla temas yoluyla enfeksiyon olasılığı vurgulanmıştır (47). Elde edilen veriler annenin HPV DNA yükü ile bunu yenidoğana aktarma potansiyeli arasında korelasyon olduğunu göstermektedir. Yirmi yıldan fazla süre devam eden topluma dayalı başka bir araştırmada elde edilen veriler, siğilleri olan kadınların çocuklarında HPV kaynaklı bir hastalık olan juvenil laringeal papillomatozis gelişme riskinin 200 kat arttığını göstermiştir (48). Son olarak, kendi kendine bulaştırma potansiyel bir bulaş yolu olarak söylenmektedir. Bu durum hiç cinsel ilişkiye girmeyen kadınlarda genital siğil varlığını araştıran ve cinsel istismar

öyküsü olmadan genital siğilleri bulunan çocuklarla yapılan bazı araştırmalarda tartışılmıştır (49, 50).

HPV enfeksiyonları tüm dünya genelinde görülmekle birlikte, yaygınlığı ülkeler arasında homojen olarak dağılmamaktadır. Farklı coğrafyalardan farklı oranlarda HPV prevalansı bildirilmektedir. HPV enfeksiyonu özellikle orta ve düşük gelirli sınıfa giren ülkelerde daha fazla görülmektedir (8). Servikal sitolojisi normal olan kadınlarla yapılan 3 farklı çalışmada HPV enfeksiyonunun genel prevalansı yaklaşık %11 olarak bildirilmiştir, ancak önemli bölgesel farklılıklar vardır (32). Bu kadınlarda en yüksek HPV enfeksiyonu prevalansı Avustralya'da (%30,9) ve Afrika'da (%21,1) bulunmuş, bunu Avrupa (%14,2), Amerika (%11,5) ve Asya (%9,4) izlemiştir (51).

HPV enfeksiyonlarının coğrafi bölgeler bazında yaşlara göre dağılımı da homojen değildir. Dünya çapında en yüksek HPV enfeksiyonu prevalansı genç yaşlarda görülmektedir. Sonuç olarak, dünyanın tüm bölgelerinde HPV prevalansı 25 yaşın altındaki kadınlarda zirve yapar ve daha ileri yaşlarda düşer (52). Bu genellemeye istisna olarak Avrupa ve Amerika'da yaşla birlikte belirgin bir düşüş gözlenmekteyken Afrika ve Asya'da yaşla birlikte böylesine net bir düşüşe rastlanmamaktadır. Ayrıca Batı Afrika ile Orta ve Güney Amerika gibi bazı bölgelerde, yaşlı kadınlarda HPV tespitinde ılımlı bir ikinci zirve gözlenmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. HPV'nin dünya bölgelerinde yaşa göre dağılımı. ((51) numaralı kaynaktan Türkçe'ye çevrilmiştir.)

HPV genotiplerinin coğrafi dağılımına bakıldığında en yaygın türlerin HR-HPV'ler olduğu ve azalan sırayla 16, 18, 59, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 39, 51, 56 ve 53 genotiplerinin tüm dünyada bulunduğu söylenebilir (53). HR-HPV'ler az gelişmiş ülkelerde daha yaygındır. Bunun olası nedenleri; bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerin yüzdesinin daha yüksek olması, sağlık hizmetlerine erişim eksikliği ve aşılama programlarının zayıf olmasıdır. Düşük riskli (low risk: LR) HPV'ler arasında en yaygın olanları ise HPV 6 ve 11 tipleridir. Bu iki tür neredeyse tüm genital siğillerden sorumludur. Yaygınlıkları ise yine bölgelere göre farklılık göstermektedir (51).

Ülkemizde HPV sıklığına ve genotiplerin dağılımına ışık tutan, ilk kapsamlı araştırma 2012 yılına aittir (54). Bu çalışmada, elde edilen yeni veriler ve konuya ilişkin ülkemizde gerçekleştirilen daha eski çalışmaların verilerine göre Türk kadınlarında genel HPV prevalansının %10 olduğu belirtilmiştir. Bu sonuç küresel HPV prevalansına uygundur. 2014 yılında kullanıma giren HPV bazlı tarama programının değerlendirilmesi amacıyla, 2018 yılında, taranan ilk 1 milyon kadının test sonuçlarının geriye dönük incelendiği bir çalışma yapılmıştır. (16). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, numunelerin %95,1'i HPV negatif, %1,4'ü yetersiz ve geri kalan

%3,5'i ($n = 37.515$) HPV DNA pozitif saptanmıştır. Yaş gruplarına göre HPV pozitiflik oranı incelendiğinde, %4,3 (30-34), %4,0 (35-39), %3,6 (40-44), %3,2 (45-59) ve %2,8 (60-65) şeklinde yaşla beraber azaldığı tespit edilmiştir. En yüksek pozitiflik oranları İstanbul ve Akdeniz bölgelerinde görülmektedir. En yaygın HPV genotipi 16 olup, bunu 51, 31, 52 ve 18 takip etmektedir (16). Jinekolojik semptomlarla üçüncü basamak bir üniversite hastanesine başvuran kadınlarda HPV genotiplerinin retrospektif olarak tarandığı kapsamlı ve güncel başka bir çalışmada örneklerin %14,2'sinde (605/4267) HPV DNA pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışmada HPV 16 ve HPV 18, sırasıyla örneklerin %2,4 ve %0,7'sinde tespit edilmiştir (55).

2.1.5. Patogenez ve İmmünite

Daha önce de belirtildiği üzere HPV epitel dokusu için yüksek bir tropizm sergiler. Mikro yaralar sonucu ortaya çıkan bazal tabakayı enfekte eder. Bununla birlikte, viral genom replikasyonu ve virion montajı yalnızca üst katmandaki farklılaşmış hücrelerde gerçekleşebilir. İlk olarak, HPV virionu bir reseptör olarak heparin sülfat proteoglikan (HSPG) yoluyla hücrelere bağlanır ve reseptör aracılı endositoz yoluyla hücrelere girer (56). Ayrıca viral kapsidlerin etkileşimi üzerine epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyal aktivasyonunun viral giriş için kritik olduğu bilinmektedir (57). Sitoplazmaya girişin ardından, viral kapsidler endozomların içinde yer alır. Endozomların asidifikasyonu üzerine, L2 kapsid proteini açığa çıkar ve endozomal membranın lizisini tetikler. Viral giriş ve soyulmayı takiben, viral genomun DNA'sı nükleusa taşınır. HPV'nin viral kapsidleri bir nükleer por aracılığıyla çekirdeğe girebilecek kadar küçüktür. Viral DNA, bazal tabaka hücrelerinde enfeksiyon süresince hücre başına 50-100 kopya sayısına ulaşır (58). Bu ortalama kopya sayısı, enfeksiyon boyunca farklılaşmamış bazal hücrelerde stabil bir şekilde korunur.

HPV ile enfekte bazal hücreler bölündükçe, viral genomlar yavru hücrelere bölünür; bu hücreler bazal katmandan ayrılır, stratum granulosuma doğru göç eder ve farklılaşmaya uğrar (59). Normalde hücre bölünmesi yalnızca bazal tabakada meydana gelmekteyken, viral genomun kopyalanmasını sağlamak için HPV'nin farklılaşan hücreler arasındaki hücre bölünmesini yeniden etkinleştirmesi gerekir. E6 ve E7

sırasıyla p53 ve retinoblastoma proteinini (pRb) etkisiz hale getirir, bu da hücrelerin DNA replikasyon potansiyelini korumasını sağlar (60). Sonuç olarak enfekte olmuş hücreler bazal tabakayı terk ederken, E6 ve E7 proteinlerinin etkisine bağlı olarak hücre döngüsünde aktif kalırlar (61). Hücreler yüksek düzeyde farklılaşmış hücrelerde S fazına yeniden girer ve viral replikasyon için gerekli hücresel replikasyon faktörlerinin ekspresyonu aktive olur.

Suprabazal tabakalardaki farklılaşan hücrelerde E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 proteinlerinin yüksek düzeyde sentezi meydana gelir ve viral genom sayısında hücre başına 1000 kopyaya kadar artış olur. Yassı epitelin en üst tabakaları olan stratum spinosum ve stratum granulosumda gerekli viral genlerin ekspresyonuyla, genom replikasyonu belirgin şekilde hızlanır (62). Genom amplifikasyonunun ardından terminal diferansiye hücrelerde, viral kapsid proteinleri olan L1 ve L2 sentezi tetiklenir. Kapsid proteinlerinin virionda bir araya gelmesiyle viral genomik DNA'nın enkapsidasyonu olur. Yeni oluşan virionlar, en üst keratinositlerden salınır (Şekil 2.4).

HPV'nin produktif (üretken) enfeksiyonu ile yüzeyel tabakalarda koilositozis adı verilen hücresel değişim meydana gelir. Koilositozis; sitoplazmik vakuolizasyon, perinükleer hale ve genellikle büyük, hiperkromatik nükleus ile karakterize hücresel değişimi ifade eden tanımlayıcı bir terimdir (63). İnsan epitelinde DNA sentezinin E6 ve E7 ile aktivasyonu sonucu nükleer büyüme ve hiperkromazi meydana gelir. HPV'nin replikasyonu beraberinde epidermis tabakalarındaki aşırı proliferasyon sonucunda hücrelerde hiperplazi ve hiperkeratoz oluşur. E4 proteininin de keratin ağlarda sebep olduğu bozulma sonucu tipik koilositik görünüm meydana gelir. Son olarak, HPV hücrelerde lizis yapmaz, enfeksiyonun kan yoluyla bulaşan bir aşaması yoktur veya viremiye neden olmaz (64).

Bazal tabakanın enfeksiyonundan virüsün en üstten salınmasına kadar geçen süre yaklaşık 3 haftadır. Bu süre, bazal keratinositin tamamen farklılaşması ve dökülmesi için gereklidir. Enfeksiyon ile lezyonların ortaya çıkışı arasındaki süre ise oldukça değişkendir ve haftalardan aylara kadar değişebilir (65). Bu da virüsün bağışıklık sisteminden etkili bir şekilde kaçabildiğini düşündürmektedir. HPV replikasyonu, birleşmesi veya viral partikül salınımının bir sonucu olarak sitoliz veya

sitopatik ölüm yoktur çünkü keratinosit, immün gözetim bölgelerinden uzakta, ölüm ve deskuamasyona yönelik bir hücredir. Bu nedenle, HPV enfeksiyonuna iltihaplanma eşlik etmez ve bağışıklık sistemini virüsün varlığına karşı uyaracak açık bir tehlike sinyali yoktur. Konakçının patojen hakkında uzun süre bilgisiz kalması nedeniyle bu durum kalıcı, kronik enfeksiyona neden olabilir (66).

HPV'nin konak savunmasını engelleme kabiliyetine rağmen, çoğu olguda genital HPV enfeksiyonlarına karşı başarılı bir immün yanıt oluşur. Bu yanıt, lezyon regresyonu ve serum nötralize edici antikor üretimi ile ilişkili güçlü, lokal, hücre aracılı bağışıklık ile karakterizedir (66). Antikor, enfekte bireylerin tamamında olmasa da birçoğunda üretilir ve sağlam virüs partikülünün dış yüzeyinde görüntülenen L1 proteini üzerindeki konformasyonel epitoplara hedef alır (67). HPV enfeksiyonlarını takiben serum nötralize edici antikor seviyeleri düşüktür (68). Bu sadece intraepitelyal enfeksiyöz döngü olması, vireminin olmaması ve virüs partiküllerinin antijen sunan hücrelerden ve devriye gezen makrofajlardan uzakta, yüzeysel epitel hücrelerinde üretilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu faktörler antijen alımını, lenf düğümüne ulaşmasını ve naif B ve T hücrelerine sunumunu sınırlar.

Bununla birlikte, eğer immün yanıt enfeksiyonu temizleyemezse veya kontrol edemezse, genellikle belirli bir odakta yüksek riskli HPV DNA replikasyonu ile kalıcı bir enfeksiyon oluşur. Kalıcı olarak enfekte bireylerin yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplaziye ve invazif karsinoma ilerleme olasılığı yüksektir. Yapılan epidemiyolojik araştırmalarda fazla doğum sayısı, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, sigara içme ve diğer cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlarla koenfeksiyon varlığının, karsinoma ilerleme riskini arttırdığı bildirilmektedir (69).

2.2. İnsan Papilloma Virüs Hastalıkları ve Klinik Bulgular

İnsan Papilloma Virüsleri cilt ve mukozal membranlarda enfeksiyona sebep olmaktadır. Günümüzde 200'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır ve HPV tiplerinden her biri belirli bir klinik lezyonla ilişkilendirilmiştir (Tablo 2.2). Bu klinik lezyonlar iyi huylu condyloma acuminata ve verrucae vulgaresten serviks, penis, vulva ve anüsün malignitelerine kadar geniş bir yelpazede yer almaktadır (70). HPV'nin sebep

olduğu klinik lezyonlar; genital olmayan cilt lezyonları, genital olmayan mukoza lezyonları ve anogenital lezyonlar olarak üç kategoride incelenebilir.

Çıplak gözle görülebilecek kadar belirgin anogenital HPV lezyonları enfeksiyondan sonraki 3 hafta ile 8 ay arasında değişen bir sürede meydana gelmektedir. Anogenital siğillerin çoğunluğuna HPV 6 veya 11 genotipleri neden olur. Siğiller nadiren yüksek riskli HPV tipleri ile ilişkilidir. Tedavi edilmediği takdirde kendiliğinden gerileyebilir, sabit bir formda kalabilir veya boyutları artmaya devam edebilir. Anogenital siğiller, nemli yüzeyleri tutan karnabahar benzeri condylomata accuminata ve kuru yüzeylerde bulunan keratotik ve pürüzsüz papüler siğiller şeklinde görülebilir (71). Çoğunlukla asemptomatiktirler ancak bazen kaşıntıya, cinsel ilişki sonrası kanamaya, idrar yolu tıkanıklığına, yanmaya ve ağrıya neden olabilirler.

HPV enfeksiyonlarının sıklıkla genital prekanseröz lezyonlarla ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Prekanseröz lezyonlar, belirsiz sınırlara sahip morfolojik değişikliklerin sürekliliğidir. Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN), vajinal intraepitelyal neoplazi (VIN), vulvar intraepitelyal neoplazi (VaIN), penil intraepitelyal neoplazi (PIN) ve anal intraepitelyal neoplazi (AIN) prekanseröz lezyonlardır. Bu vakalarda displazi ve bazal hücrelerin atipik mitozları görülmekte olup, atipi derecesi olguların büyük çoğunda HR HPV enfeksiyonu ile önemli ölçüde korelasyon göstermektedir. En güçlü ilişki rahim ağzı kanserinde mevcuttur. HR HPV tipleri rahim ağzı kanseri lezyonlarının %90'ından daha fazlasında tespit edilebilmektedir (72). HPV enfeksiyonu ile vulva kanseri arasındaki bağlantı belirsizdir. Vulvar intraepitelyal neoplazi vakalarının çoğunda HPV DNA tespit edilebilmesine rağmen, vulvar kanser gelişmiş vakaların yarısından azında tespit edilir (73). Anal kanserlerin yaklaşık %90'ı HPV ile ilişkilidir ve HPV ilişkili olanların da %90'ı HPV 16 ve 18'den kaynaklanmaktadır (74).

Tablo 2.2. HPV ilişkili hastalıklar ve sebep olan HPV türleri. ((70) numaralı kaynaktan Türkçe 'ye çevrilmiştir.)

Genital olmayan mukozal lezyonları		Genital olmayan cilt lezyonları	
	HPV türü		HPV türü
Tekrarlayan laringeal papillomatoz	6, 11	Yaygın siğil (verrucae vulgaris)	1, 2, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 60, 63, 65
Skuamöz hücreli akciğer kanseri	6, 11, 16, 18	Plantar siğil	1, 2, 4, 63
Laringeal kanser	16, 18	Düz siğil (verrucae plana)	3, 10, 27, 28, 29, 38, 41, 49
Fokal epitelyal hiperplazi (Heck hastalığı)	13, 32	Kasap siğili	1, 2, 3, 4, 7, 10, 28
Konjonktival papillomlar	6, 11	Mozaik siğil	2, 27, 57
Ağız siğilleri	2, 4	Epidermodisplazi verrüsiformis	3, 4, 5a, 5b, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36-38, 47, 49, 50, vb.
Oral kondiloma	6, 11	Seboreik keratoz	6, 11, 31, 33
Florid oral papillomatoz	6, 11	Stucco keratoz	9, 16, 23b, 37
		Et beni	6, 11
Anogenital lezyonlar	HPV türü	Epidermal kistler	57, 60
Genital siğil (condylomata acuminata)	6, 11, 30, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 54	Melanom dışı cilt kanseri (bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom, Bowen hastalığı)	8, 15, 20, 23, 36, 38,
Bowenoid papüloz	16, 18, 34, 39, 42, 45	Aktinik keratoz	8
Bowen hastalığı	16, 18, 31, 34	Keratoakantom	1, 2, 5, 6, 9, 14, 16, 18, 19, 25, 35, 37, 58, 61
Gigantski kondilom (Buschke-Löwenstein)	6, 11	Displastik melanositik nevüs ve melanom	2, 16, 33
Düşük dereceli intraepitelyal neoplaziler	6, 11, 43	Sedef hastalığı	5, 36
Yüksek dereceli intraepitelyal neoplaziler	16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 62,	Liken sklerozu	16, 18, 45
Bowenoid papüloz	66	Darier hastalığı	5, 36, 38
Eritroplazi Queyrat			
İnvazif kanser			

Bowenoid papüloz, klinik olarak genital siğillere benzeyen lezyonlardır ancak histolojik olarak yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar veya in situ skuamöz hücreli karsinomdur. Başta HPV 16 ve 18 olmak üzere HR HPV tipleriyle ilişkilidir (75). Eritroplazi Queyrat; penis mukozasının in situ karsinomudur. Ayrıca üretra, vulva, konjunktiva, dil ve ağız mukozasında da görülebilir. Buschke-Löwenstein tümörü (dev condylomata accuminata), genital bölgede büyük, yıkıcı bir tümördür. Genellikle penis başı ve sünnet derisi, vulva, vajina ve perianal bölgede bulunur. Histolojik olarak iyi huylu görünümüne ve yüksek lokal nüks oranına rağmen, altta yatan dokularda lokal tahribata neden olma ve skuamöz hücreli karsinoma dönüşme olasılığı vardır (76). Buschke-Löwenstein tümörü genellikle düşük riskli HPV tip 6 veya 11 ile ilişkilidir.

Genital olmayan lezyonlara baktığımızda kutanöz ve mukozal HPV tipleri, iki ayrı grup oluşturur. En sık görülen kutanöz HPV kaynaklı lezyon, düşük riskli HPV tiplerinin sebep olduğu ve cilt yüzeyinin herhangi bir bölgesinde oluşabilen siğil veya

verruka vulgaristir. Çoğunlukla HPV tipleri 1, 2, 4, 27 ve 57'den kaynaklanırlar ancak nadiren 57, 60, 63, 65 ve 66 gibi diğer HPV tipleri izole edilebilir (77). Diğerlerine göre daha sık görülen iyi huylu lezyonlara; plantar siğiller, derin palmoplantar siğiller, düz siğiller ve kasap siğilleri (et ve balıkla uğraşan kişilerde) örnek olarak verilebilir. Genital olmayan mukozal lezyonlar arasında; tekrarlayan laringeal papillomatozis, laringeal kanser, konjonktival papillomlar, ağız siğilleri ve oral kondiloma da sayılabilir. Bu mukozal lezyonların büyük çoğunluğundan HPV 6 ve 11 tipleri sorumludur (70).

Epidermodisplazi verrüsiformis nadir görülen, otozomal resesif genetik bir hastalıktır. HPV enfeksiyonuna karşı bozulmuş hücrel bağışıklık ile karakterizedir. Epidermodisplazi verrüsiformis'li hastaların erken çocukluk dönemlerinde tipik olarak el sırtında, ekstremitelerde, yüzde ve boyunda düz siğil benzeri lezyonlar ortaya çıkmaktadır (78). Bu hastaların %30 ile %70 'inde, başta skuamöz hücreli karsinom olmak üzere malign deri tümörleri gelişebilmektedir. Bunun meydana gelmesi ortalama 20 ile 40 yaş arasına denk gelmektedir. Bu tümörlerin metastatik kapasiteleri düşüktür ve öncelikle alın, kulaklar ve eller gibi güneşe maruz kalan bölgelerde gelişmektedir. Bu da ultraviyole (UV) ışınlamasının önemli bir kokarsinojen olduğunu göstermektedir. Epidermodisplazi verrüsiformis'li hastalardaki lezyonlar, vakaların %90'ından fazlasında HPV tip 5 veya 8 içerir (79).

2.3. İnsan Papilloma Virüs Laboratuvar Tanısı

HPV enfeksiyonunun tanısı için kullanılacak yaklaşım, tanı koymanın altında yatan amaca bağlı olmaktadır. Bu amaçlar, HPV'nin mevcut olup olmadığını, aktif bir enfeksiyonun mevcut olup olmadığını, enfeksiyonla hangi HPV tipinin ilişkili olduğunu ve enfeksiyonla ilişkili hücrel atipinin derecesinin belirlenmesini içerebilir (2). HR HPV tipleri serviks kanseri başta olmak üzere çeşitli kanserlerin etyopatogenezinde önemli rol oynamaktadır ve laboratuvara gelen örneklerin büyük çoğunluğu da kanser tarama programları dahilinde alınan örnekler olmaktadır. HPV'nin klinik örneklerden kültürü mümkün değildir ve tanı sitolojik, histolojik veya moleküler yöntemlere dayanır (80).

2.3.1. Sitolojik ve Histolojik İnceleme

Bu yöntemler ile doğrudan virüsün kendisinin tespiti değil, hücrelerde veya dokularda meydana getirdiği değişikliklerin tespiti yapılmaktadır. HPV türleriyle kalıcı enfeksiyon sonucunda, sitolojik olarak atipik skuamöz hücreler (ASC), atipik glandüler hücreler (AGC), düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (LSIL) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (HSIL) şeklinde anormal sitoloji tanıları ve ayrıca biyopsiyi takiben histolojik olarak servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) 1 ile 3, endoservikal adenokarsinom (AIS) ve kanser gibi tanımlar konulabilir.

Sitolojik inceleme, serviks kanseri tarama programı dahilinde uzun yıllardır uygulanmaktadır. Pap testi, 1940'larda geliştirilmiştir ve pul pul dökülmüş servikal hücrelerin morfolojik değerlendirmesine dayanmaktadır. Geçtiğimiz 15-20 yıl içerisinde konvansiyonel sitoloji yerini 'sure-path' veya 'thin-prep' adı ile anılan sıvı bazlı sitolojiye bırakmıştır (81). Sıvı bazlı sitoloji için servikal örnekler toplanırken analizler için yeterli miktarda hücre toplanmasını sağlayan özel endoservikal fırçalar kullanılır. Bu fırça ile endoserviks, ektoserviks ve özellikle servikal kanserin en çok görüldüğü yer olan servikal transformasyon zonu olarak da adlandırılan skuamokolumnar bölgeden hücreler toplanır ve özel bir sıvı solüsyon içerisine aktarılır. Laboratuvarında fırça önce koruyucu sıvı içeren bir şişede durulanır ve ardından bir lama aktarılır. Laboratuvarında, lam üzerinde tek tip bir hücre tabakası hazırlanır. Bu hücre transferi yöntemiyle geleneksel sitolojiye kıyasla tüm örneğin daha doğru temsil edilmesi sağlanmaktadır (82). Kullanılan sıvı bazlı sitolojik yöntemle uygun prosedürle preparat hazırlanır ve mikroskop altında incelenir.

Sitolojik inceleme sonucunda anormallik tespit edilmesi halinde, servikal kanseri doğrulamak için servikal histolojik inceleme yapılır. Endoservikal küretaj veya kolposkopik biyopsilerden elde edilen doku örnekleri işlenir, boyanır ve mikroskop altında incelenir. Histolojik inceleme, kanserin derecesini ve yayılma olasılığını belirlemeye yardımcı olur (83). Ki-67 veya p16 gibi biyobelirteçlerle yapılan ileri incelemeler ile hastalığın prognoz tahmini ve tedavi planlaması sağlanabilir.

2.3.2. Moleküler Yöntemler

HPV'nin geleneksel hücre kültürü ortamlarında üretilmemesi ve serolojinin mevcut enfeksiyon ile geçmiş enfeksiyon ayrımını yapamamasından dolayı HPV enfeksiyonlarının doğru tanısı viral nükleik asit tespitine dayanmaktadır (84). HPV DNA, farklı yöntemler ile servikal sürüntü örneklerinden veya biyopsilerden saptanabilir. Bu yöntemlerden in situ hibridizasyon sitolojiyi tamamlayıcı özelliktedir. Bu yöntemde hücre içi HPV DNA'sına özgül hibridizasyon problemleri kullanılır. Bu yöntemin duyarlılığı düşüktür ancak enfeksiyonun sınırlarının anlaşılmasını sağlayabilir (85). Alternatif olarak klinik örnekten doğrudan HPV DNA izole edilebilir ve 'southern blot' yöntemiyle tespit edilebilir (86). Ancak bu yöntem de duyarlılığının düşük olması ve fazla emek gerektirmesinden ötürü verimli bir tarama testi değildir. Bu nedenle HPV DNA tespitinin özgüllük ve duyarlılığını arttırmak amacıyla nükleik asit amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir.

HPV DNA tespiti, rutin tarama testlerinin bir parçası olan servikal sitolojik inceleme için alınan örnekten yapılabilir. DNA izolasyonu için bu servikal hücre süspansiyonunun küçük bir kısmı kullanıldığından, eğer numune kısıtlı miktarda HPV DNA kopyası içeriyorsa örnekleme hataları nedeniyle hassas bir testte bile sonuçlarda tutarsızlıklar görülebilmektedir (87). Numunenin laboratuvara taşınması ve saklanması sırasındaki stabilitesi de önemlidir. Endojen nükleazların varlığından kaynaklanan hatalı negatif sonuçları önlemek için viral nükleik asit uygun şekilde korunmalıdır. Laboratuvara gelen klinik örneklerden DNA izolasyonu için çeşitli yöntemler mevcuttur. Gelen klinik materyalin türüne ve kalitesine, kullanılan tanı testine ve laboratuvarın ihtiyaçlarına göre farklı nükleik asit izolasyon yöntemleri veya otomatize nükleik asit izolasyon cihazları kullanılabilir (84).

HPV DNA'nın çözeltideki etiketli DNA problemlerine hibridizasyonuna dayanan sinyal amplifikasyon yöntemlerini kullanan testler [Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (Qiagen, ABD), Cervista HPV HR Test (Hologic, ABD)] mevcut olmasına karşın günümüzde moleküler testlerde daha çok tercih edilen yöntem HPV DNA'daki hedef bölgenin çoğaltılmasıdır. PZR en yaygın kullanılan hedef çoğaltma yöntemidir. Bir

termal döngü cihazı vasıtasıyla, termostabil bir DNA polimeraz varlığında, hedef bölgeyi sınırlayan oligonükleotid primerler kullanılarak hedef bölge çoğaltılır.

PZR; belirli bir DNA parçasının döngüler boyunca kopyalanarak çoğalmasına olanak tanıyan, yaygın kullanılan bir tekniktir. PZR'nin temelde beş ana bileşeni vardır: 1) Kopyalanacak DNA segmenti yani şablon (kalıp) DNA, 2) DNA'nın yapı taşları deoksिनükleotid trifosfatlar (dNTP'ler) [adenin trifosfat (ATP), timin trifosfat (TTP), guanin trifosfat (GTP) ve sitozin trifosfat (CTP)], 3) nükleotidleri birleştiren termostabil bir DNA polimeraz (Taq DNA Polimeraz), 4) hedef DNA'ya tamamlayıcı başlangıç dizileri yani oligonükleotid primerler ve uygun iyon gücü ve pH'a sahip tampon çözeltisi (88). PZR'nin temelde üç basamağı vardır. Denatürasyon basamağında sıcaklık 94-96 °C'ye yükseltilerek DNA'nın çift iplikli yapısının birbirinden ayrılması sağlanır. İkinci adım olan bağlanmada sıcaklık yaklaşık 55°C civarına indirilir ve primerler şablon DNA üzerindeki tamamlayıcı bölgelere bağlanır. Son adımda sıcaklık yaklaşık 72°C'ye yükseltilerek DNA polimerazın primerlerin uçlarına nükleotidler ekleyerek iki yeni çift iplikli DNA üretmesi yani şablon DNA'yı kopyalaması sağlanır.

PZR'deki üç basamağın birbirini takip eden döngüler halinde tekrarlanmasıyla şablon DNA miktarı her döngüde bir öncekinin iki katına çıkmaktadır. Her biri yaklaşık 1-1.5 dakika süren toplamda 35-40 adet döngü sonucunda tespit edilebilecek DNA kopya miktarı milyar adete kadar ulaşmaktadır. PZR'nin gerçekleştirilmesi için, dış ortamdan etkilenmeden içerisindeki sıcaklığı yükseltip azaltabilen bir termal döngü cihazı gerekmektedir. PZR'de kullanılan Taq DNA Polimeraz enzimi termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan elde edilir. Bu enzim DNA'yı denatüre etmek için kullanılan yüksek sıcaklıklarda ve primerlerin özgüllüğünü arttıran kısmen yüksek bağlanma sıcaklıklarında aktivitesini korur (88).

Özellikle tek bir HPV genotipine özgül tasarlanmış primerler kullanılabilir ancak bu durumda aynı örnekten farklı HPV genotiplerini aramak için PZR reaksiyonun ayrı ayrı gerçekleştirilmesi gerekir. Alternatif olarak, geniş bir yelpazede HPV genotiplerini çoğaltmak için konsensus veya genel PZR primerleri kullanılabilir. L1 bölgesi HPV genomu içerisinde en çok korunmuş bölge olduğu için farklı

konsensus primer setleri bu bölgeyi hedef almaktadır (89). Geniş yelpazede HPV genotipini çoğaltabilecek genel PZR için primer tasarımı temel olarak üç farklı yolla yapılmaktadır. İlk yöntem, korunmuş bir bölgeyi hedefleyen, birkaç genotipe uygun bir ileri ve bir ters primeri içerir. Diğer genotiplerle olan uyumsuzluğu gidermek için PZR düşük bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilir (90). GP5+/6+ primer sistemi bunun örneğidir. İkinci yöntemle hazırlanan genel primerler genotipler arası dizi varyasyonunu telafi etmek amacıyla bir veya daha fazla dejenere baz içerir. Aslında bu primer seti birçok farklı oligonükleotidin kompleks bir karışımını içermektedir (84). Böyle olduğunda düşük bağlanma sıcaklığı gerekmez. MY09/11 primerleri dejenere PZR primer setinin bir örneğidir. Üçüncü yöntem ise genomun aynı bölgesini hedef alan birkaç tane ileri ve geri primeri birleştirmektir. Bu primerler rastgele dejenereasyonlar içermezler ama herhangi bir nükleotidle eşleşen inozin içerebilirler. PGMY ve SPF₁₀ primerleri bu yöntemle geliştirilen primerlere örnektir (91). PZR için primer seçimi kadar reaksiyonlar sonucu oluşan ürünün boyutu da önemlidir. Amplikon boyu arttıkça PZR reaksiyonunun etkinliği azalmaktadır. Sonuç olarak, küçük ürün üreten primerlerin etkinliği, büyük amplikon üreten primer setlerine göre daha yüksektir (92).

Hedef bölgenin çoğaltılmasının ardından PZR amplikonları standart agaroz jel elektroforezi ve DNA boyaları ile kolayca gözle görülür hale getirilebilir. HPV DNA'yı tespit etmek için gerçek zamanlı PZR de kullanılabilir. Tipe özgü PZR primerleri, gerçek zamanlı tespit için floresan işaretli problarla birleştirilebilir (93). Tespit aşamasında farklı yöntemler kullanan PZR tabanlı çeşitli yöntemler mevcuttur. PZR tabanlı HR HPV DNA tarama yapan enzim immunoassayler, PZR sonrası strip, membran veya mikropakta hibridizasyon bazlı HPV genotiplendirme testleri, PZR sonrası mikroarray tabanlı HPV DNA tam genotiplendirme testleri, PZR sonrası mikrosfer tabanlı HPV tam genotiplendirme testleri, kütle spektrometrisi ile PZR bazlı tam genotiplendirme, HPV E6/E7 mRNA testleri örnek olarak verilebilir (94). En büyük yani üzerine en çok çalışılan ve en fazla sayıda ticari ürüne sahip grup, floresan boyalar ile işaretli diziye özgü DNA problemleri kullanılan, araştırılan HPV genotiplerinin amplifikasyonu ve tespitini eş zamanlı olarak yapabilen gerçek zamanlı PZR tabanlı

testlerdir. Gerçek zamanlı PZR testleri ile HR HPV'lerin tespiti ve genotiplendirilmesi günümüzde tanı laboratuvarlarında en sık kullanılan moleküler yöntemdir.

PZR yöntemi, geliştirilmesinin ardından geçen yıllar içinde dünya genelinde tanı laboratuvarları başta olmak üzere farklı birçok alanda yaygın olarak kullanılmıştır. Bu süreçte bilim insanları yöntemin daha çok insana ulaşım, daha ucuz ve daha faydalı bir tanı yöntemi olabilmesi için bazı kısıtlamaların üstesinden gelmeye çalışmıştır. PZR basamaklarının farklı sıcaklıklarda gerçekleşiyor olması ve bunun için bir termal döngü cihazı gerektirmesi üstesinden gelinmeye çalışılan zorluklardan en önemlisidir. Geçen yıllar içerisinde sabit sıcaklıkta DNA kopyalamayı sağlayan farklı izotermal amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir (95). Bu yöntemlere nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA), iplik yer değiştirme amplifikasyonu (SDA), rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA), üstel amplifikasyon reaksiyonu (EXPAR) ve döngü aracılı izotermal amplifikasyon yani LAMP yöntemi örnek olarak verilebilir.

2.4. LAMP Yöntemi

Yöntem ilk olarak 2000 yılında yayımlanan bir makale ile yeni bir izotermal amplifikasyon yöntemi olarak, Notomi ve arkadaşları tarafından tanıtılmıştır (18). Temel olarak LAMP, izotermal koşullar altında bir hedef DNA dizisini yüksek duyarlılık ve özgüllükle çoğaltan bir amplifikasyon reaksiyonudur. Hızlı, uygun maliyetli, özgüllüğü yüksek ve tespit aşamasında farklı yöntemlerin kullanımına açık bir yöntem olmasıyla bilim insanlarına PZR alternatifi olabilecek potansiyeli barındırdığını düşündürmüştü ve yoğun ilgi çekmiştir. DNA üzerine yapılan çalışmalara ek olarak yöntemin uygulama alanlarını genişletmek amacıyla, reaksiyon karışımına bir ters transkriptaz eklenmiş ve RNA'nın amplifikasyonu için Ters Transkripsiyon (RT) LAMP yöntemi geliştirilmiştir (96). Literatürde, klinik örneklerden farklı patojenlerin saptanması amacıyla LAMP veya RT-LAMP yöntemlerinin kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (17). SARS-CoV-2 pandemisinin meydana gelmesi hızlı ve güvenilir hasta başı testler yapabilmek için moleküler yöntem geliştirme çalışmalarına hız kazandırmış, LAMP yöntemine var olan mevcut ilgiyi arttırmıştır.

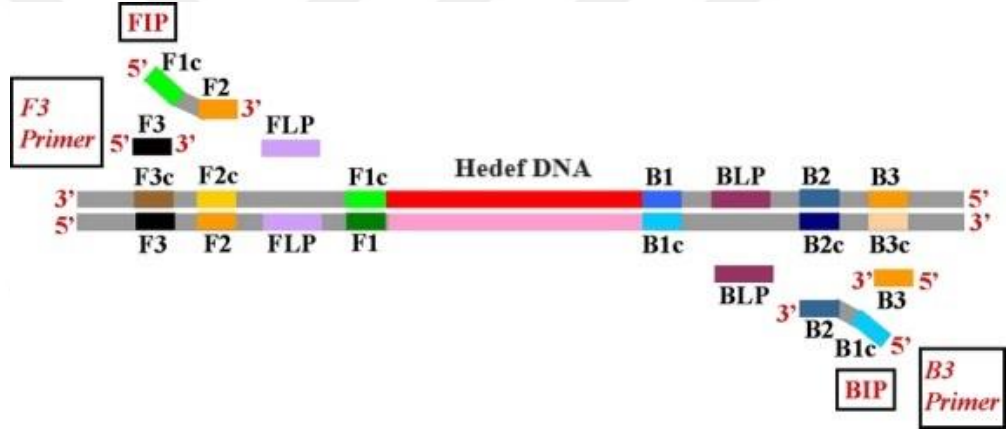
LAMP reaksiyonlarının mekanizmaları ve reaksiyon karışımının içerikleri daha sonraki bölümlerde detaylı olarak açıklanacaktır. LAMP'ı PZR'den ayıran temel özelliklerden bir tanesi primer sayısı ve tasarımıdır. LAMP reaksiyonlarında hedef DNA'daki altı ayrı bölgeyi tanıyan iki iç primer (FIP, BIP) ve iki dış primer (F3, B3) tasarlanır ve bu sayede yüksek özgüllük sağlanır. Döngü primerleri adı verilen ve reaksiyonların hızlanmasını sağlayan iki tane primer daha bu sisteme dahil edilebilir. LAMP reaksiyonlarının PZR'den bir diğer farkı da LAMP için iplik yer değiştirme aktivitesine sahip bir DNA polimeraz kullanılmasıdır. Bu sayede yüksek sıcaklıklarda DNA denatürasyonu yapılmasına gerek kalmamaktadır. Reaksiyonda kullanılan Bst Polimeraz, *Geobacillus stearothermophilus*'tan (eski ismiyle *Bacillus stearothermophilus*) elde edilmektedir. Özellikle iç primerlerin tasarımı ve kullanılan enzimin iplik yer değiştirme aktivitesine sahip olması LAMP reaksiyonlarında oluşması beklenen döngü yapısının ortaya çıkışı için önemlidir. İlmek yapısı reaksiyona döngü özelliğini kazandırmakta ve kısa sürede çok miktarda DNA çoğaltılabilmektedir (18).

2.4.1. LAMP Çalışma Prensipleri

LAMP yöntemi ile DNA amplifikasyonu gerçekleştirebilmek için reaksiyon ortamında temel olarak çoğaltılacak hedef DNA bölgesi, hedef bölgeye özel olarak tasarlanmış primerler, iplikçik yer değiştirme aktivitesi de bulunan Bst Polimeraz enzimi, enzimin aktivitesi için magnezyum (Mg) iyonu, hedef DNA'nın çoğaltılması için kullanılacak olan dNTP'ler ve reaksiyonun uygun ortamda ilerleyebilmesi için tampon çözeltisi bulunmalıdır. LAMP reaksiyonunun doğru bir şekilde gerçekleşmesinden sorumlu olan esas unsur primerlerin tasarım aşamasıdır. Konsantrasyon, nükleotid çiftlerinin konumu ve DNA bölgeleri arasındaki mesafe gibi bir dizi faktör açısından primerlerin optimize edilmesi gerekmektedir. Primerler 60–65 °C'de tek iplikli bir yapıya sahip olmalı ve stabil bir çift iplikli yapı oluşturmamalıdır (17). Reaksiyonların meydana geliş dinamiklerinin anlaşılması için öncelikle özgün primer tasarımı açıklanmalıdır.

LAMP primerlerinin tasarımı, hedef dizideki 5' uçtan itibaren F3, F2, F1, B1, B2 ve B3 olarak belirlenen altı bölgeye dayanmaktadır (Şekil 2.6). İleri İç Primer

(FIP), F2c bölgesini tamamlayıcı olan F2 dizisinden (primerin 3' ucunda) ve 5' ucunda F1c bölgesi ile aynı diziden oluşur. Geri İç Primer (BIP), B2c bölgesine tamamlayıcı olan B2 dizisinden (primerin 3' ucunda) ve 5' ucunda B1c bölgesi ile aynı diziden oluşur. Reaksiyonu hızlandırmak için isteğe bağlı kullanılabilen döngü primerlerinden İleri Döngü Primeri (FLP), F1 ve F2 arasındaki bölgeye karşılık gelen tamamlayıcı iplik kullanılarak tasarlanırken, Geri Döngü Primeri (BLP), B1 ve B2 arasındaki bölgeye karşılık gelen tamamlayıcı iplik kullanılarak tasarlanmaktadır (97). Genel olarak iç primerler daha uzundur (45-49 bp) ve şablon üzerindeki iki uzak bölgeye tamamlayıcıdır. Dış primerler ise daha kısadır (21-24 bp) ve şablona iç primerlerden daha yavaş bağlanması için reaksiyon karışımında daha düşük konsantrasyonlarda bulunmalıdır.

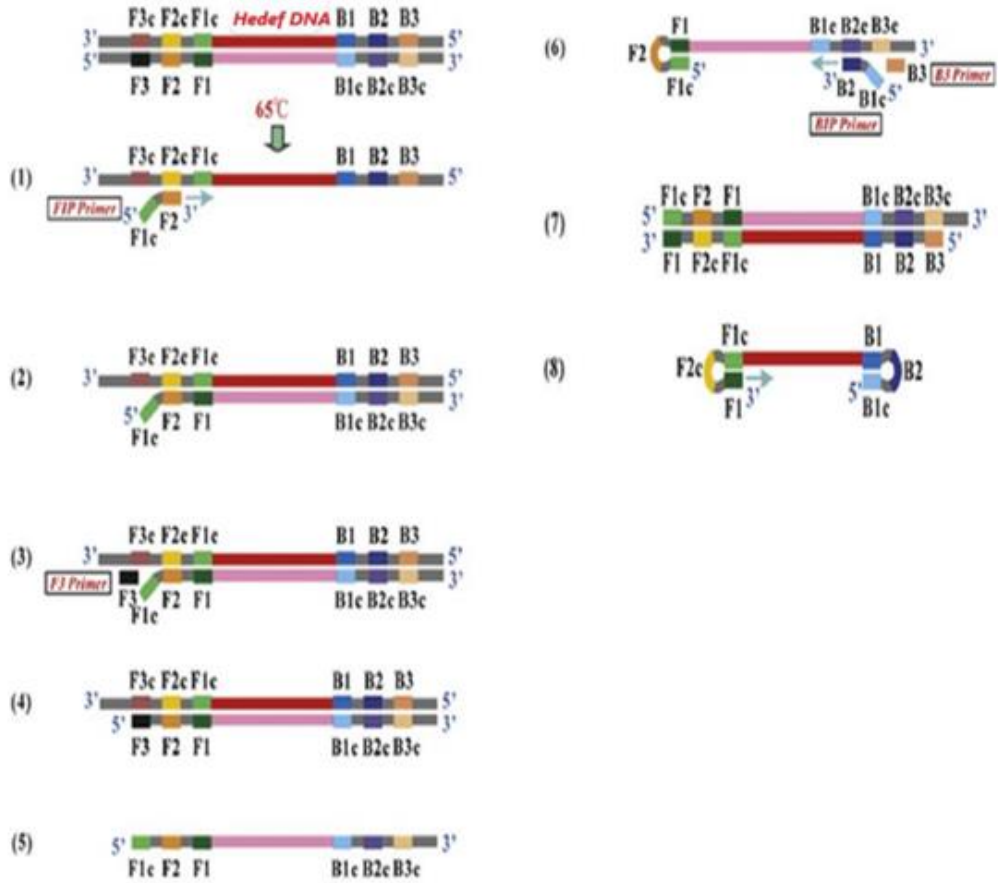


Şekil 2.6. LAMP reaksiyonunda kullanılan primerler. ((97) numaralı kaynaktan aynen alınmıştır.)

PZR'nin aksine LAMP reaksiyonları sabit sıcaklıkta gerçekleştiğinden primer tasarımı esnasında primerlerin erime sıcaklıklarının (T_m) doğru bir biçimde seçilmesi başarılı reaksiyonlar için önemlidir. Reaksiyonlar esnasında çok sayıda primerin hedef bölgeye bağlanmasının uygun sıcaklıkta hassas bir şekilde düzenlenmesi gerekir. Primerlerin boyunun T_m değerleri göz önünde bulundurularak uzatılması veya kısaltılması gerekebilir. Bir diğer dikkat edilecek nokta ise primerlerin özellikle de FIP ve BIP iç primerlerinin, ikincil yapıların gelişimini önleyecek biçimde tasarlanmasıdır. Moleküller arası etkileşimler sonucu oluşacak ikincil yapılar ürün verimini düşürecektir (98). Primerler tasarlanırken, F2'nin sonundan B2'nin sonuna kadar olan mesafe yaklaşık 120-160 baz çifti olacak şekilde ayarlanır. Bu bölge amplifikasyon

reaksiyonları sonucu oluşacak LAMP amplikonuna denk gelir ve dambıl yapısının boyutuyla yakından ilişkilidir. LAMP primerlerinin tasarımı için kullanılabilecek PrimerExplorer, LAMP Designer Optigene veya Premier Biosoft gibi çevrimiçi yazılımlar mevcuttur (17).

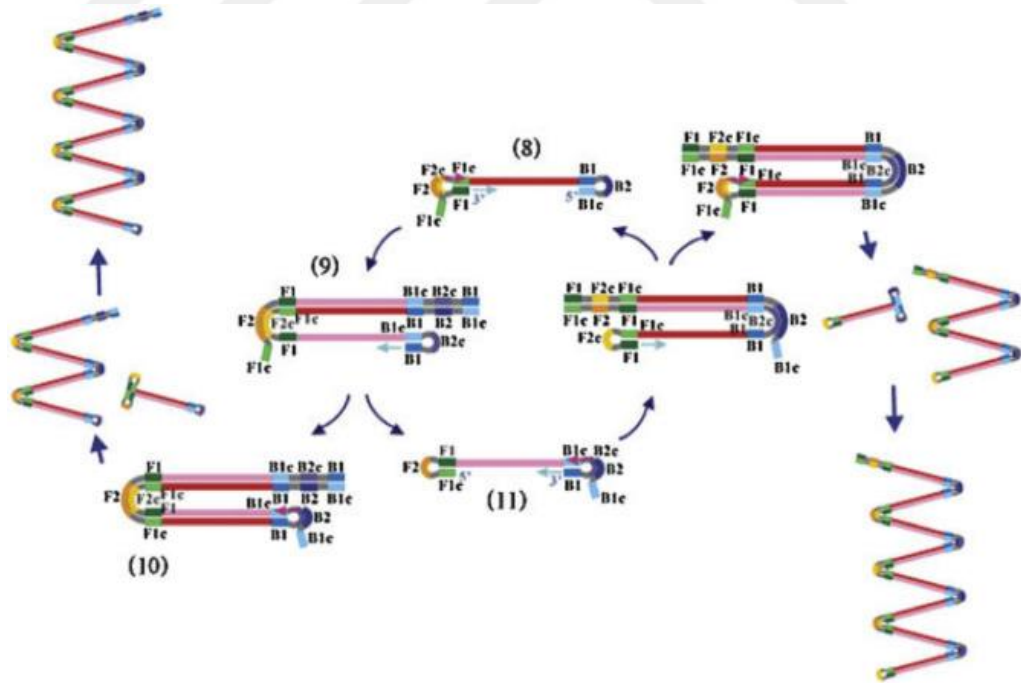
LAMP reaksiyonları ile amplifikasyon temel olarak üç basamakta gerçekleşmektedir. İlk olarak başlangıç yapısı olan dambıl şeklinde tek iplikli DNA'nın üretimi olur (Şekil 2.7). Devamında döngüsel amplifikasyon meydana gelir ve son olarak uzama ile geri dönüşüm basamağı gerçekleşir.



Şekil 2.7. LAMP reaksiyon basamaklarının dambıl şekilli DNA oluşumuna kadar şematik gösterimi. ((99) numaralı kaynaktan alınmıştır.)

Tasarlanan dört primerin tamamı reaksiyonun başlangıç evrelerinde görev alır. Sonraki döngü aşamalarında, sarmal yer değiştirme için yalnızca iç primerler (FIP ve

BIP) görev alır. Primer tasarımı göz önüne alındığında bu iç primerlerin LAMP reaksiyonlarında ana rolde olduğu söylenebilir. Başlangıç yapısının üretimine bakacak olursak, DNA sentezi öncelikle FIP'ten başlar. Uygun reaksiyon sıcaklığında FIP'ın F2 bölgesi hedef DNA üzerindeki komplementeri olan F2c bölgesiyle bağlanır ve tamamlayıcı iplik sentezi başlatılır (1, 2 numara). Dış primer olan F3, hedef DNA üzerindeki F3c bölgesiyle eşleşir ve yeni DNA zincirinde (3 numara) enzimin iplik yer değiştirme aktivitesi gerçekleşir. Bunun sonucunda bir ucunda FIP bağlı olan tamamlayıcı zincir serbest kalır (4 numara). Serbest kalan bu tek iplikli yapı (5 numara) 5' ucunda ilmik benzeri bir yapı oluşturur ve diğer iç primer olan BIP ile başlatılacak DNA sentezi için bir şablon görevi görür (6 numara). Daha sonra dış primer B3, B3c ile hibridize olur ve sarmal yer değiştirme reaksiyonu ile DNA sentezi gerçekleşir (7 numara). Enzimin aktivitesi sonucu diğer zincirin uzaklaşmasıyla dambıl şekilli DNA (kök döngü DNA) oluşmuş olur (8 numara). İki ucunda döngü yapısı bulunan bu dambıl şekilli DNA, LAMP reaksiyonlarının sonraki aşamaları (Şekil 2.8) için başlangıç yapısı olarak görev almaktadır.



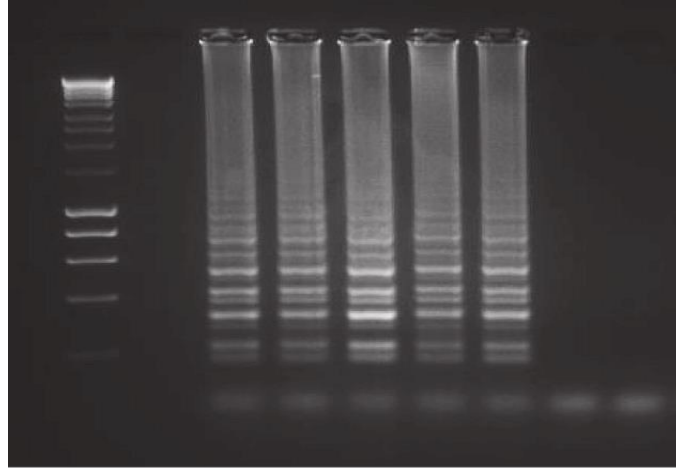
Şekil 2.8. Dambıl şekilli DNA oluşumundan sonraki LAMP reaksiyonlarının şematik gösterimi. ((99) numaralı kaynaktan alınmıştır.)

Döngüsel amplifikasyonun başlangıcında FIP, dambıl şekilli DNA'nın 3' ucundaki döngü yapısına hibridize olur (8 numara) ve BIP aracılığıyla 5' uçta oluşturulan diğer döngü yapısına doğru iplik yer değiştirmeli DNA sentezi gerçekleşir (9 numara). DNA sentezi sonucu oluşan ürünler, dambıl DNA'nın bir tamamlayıcı yapısını ve karşı uçtaki kök döngü DNA'sını içerir (10 numara). Bu ürünler daha sonraki döngülerde, uzama ve geri dönüşüm basamağında BIP ile iplik yer değiştirme reaksiyonu için şablon (11 numara) işlevi görür. Böylelikle LAMP reaksiyonlarında amplifikasyon kendi kendini büyütür; sentezlenen her iplik, oluşan yeni döngü yapılarının uzamasıyla yer değiştirir (18). Nihai ürünler yani amplikonlar hedefin birkaç tekrarına sahip kök döngü DNA'ları ve çoklu döngülere sahip farklı boyutlarda yapılardır.

2.4.2. LAMP Amplifikasyon Ürünlerinin Tespiti

LAMP yönteminde amplifikasyon reaksiyonları sonrasında amplikonların tespiti amaçlı farklı metotlar kullanılabilmektedir. Sıklıkla kullanılan tespit yöntemleri arasında bulanıklık ölçümü, agaroz jel elektroforezi, çıplak gözle kolorimetrik tespit ve UV ışığı kullanılarak tespit yer alır. Bulanıklık ölçümü, LAMP reaksiyonlarının bir yan ürünü olan magnezyum pirofosfatın ($Mg_2P_2O_7$) neden olduğu beyaz çökeltiyi saptamaya dayanır (100). Türbidimetrik ölçümün mevcut olmadığı durumda çıplak gözle görülen beyaz çökeltinin gözlenmesine alternatif olarak, LAMP ürünlerinin kısa süreli santrifüjlenmesi alternatif olarak kullanılabilir (101).

LAMP son ürünlerini görselleştirmek için agaroz jel elektroforezi kullanılabilmektedir. LAMP'da amplifikasyon reaksiyonlarının son ürünleri hedefin birkaç kez ters çevrilmiş tekrarını içeren, çoklu döngülere sahip yapılardır ve bunlar jel üzerinde merdiven benzeri veya molekül ağırlık standardı ('DNA Ladder') benzeri görüntü meydana getirmektedir (Şekil 2.9). Jel elektroforezi ile görüntüleme reaksiyon tüplerinin açılmasını gerektirmekte, bu nedenle kontaminasyon riskini arttırmaktadır.

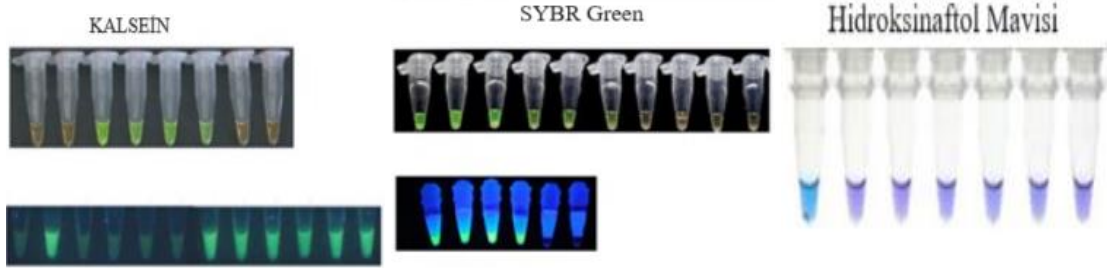


Şekil 2.9. LAMP ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

LAMP reaksiyon ürünlerinin doğrudan tespiti için kalsein, SYBR Green ve hidroksinaftol mavisi gibi, moleküllerin arasına girme kabiliyeti bulunan interkalasyon boyaları kullanılabilir (100). Reaksiyonların başlangıcından önce eklenen bir metal iyonu bağlayıcı florofor olan kalsein boyası, çözünmeyen bir tuz kompleksi olan manganez pirofosfat oluşturarak reaksiyonu floresan hale getirmektedir. Daha sonra, serbest kalsein magnezyum iyonlarına bağlandığında floresan daha da yoğunlaşır ve UV ışığı altında kolayca gözlemlenebilir (102). Mg^{+2} ve kalsein arasındaki reaksiyon aynı zamanda doğal ışık altında çıplak gözle görülebilen turuncudan yeşile renk değişimine (Şekil 2.10) neden olur. Pozitif LAMP reaksiyonu yeşil renk oluştururken, negatif LAMP reaksiyonu turuncu renk görülmektedir. Kalsein kullanımı ile son ürün tespiti yüksek hassasiyet ve çıplak gözle inceleme için renk değişimi sağlaması nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir (103).

SYBR Green boyası LAMP ürünlerinin tespiti için kullanılabilen bir diğer boyadır. LAMP son ürünlerini içeren reaksiyon tüplerine eklenmesiyle pozitif örneklerde kırmızıya yakın bir turuncudan sarıya yakın bir yeşile görünür renk değişimi (Şekil 2.10) olmasına sebep olur ve UV ışığı altında floresan verir (100). Kalseinin aksine reaksiyon karışımına önceden eklenmesi LAMP reaksiyonlarını inhibe edebilmektedir. Sonradan eklendiği için kontaminasyon riski de bulunmaktadır. Hidroksinaftol mavisi de LAMP ürünlerinin görsel yorumlanması için sıkça kullanılmıştır. Ancak bu boya floresan özelliği göstermez ve yalnızca çıplak gözle

okunabilen renk değişikliğinin yorumuna dayanır. Hidroksinaftol mavisi pozitif reaksiyonlarda menekőe morundan gök mavisi renge (Şekil 2.10) dönüőür (104).



Şekil 2.10. LAMP  r nlerinin tespitinde kullanılan boyalar ve renk değişimleri.

Son zamanlarda, LAMP ürününü tespit etmek için yanal akış testi geliştirmeye çalışan araştırmaların sayısı artmıştır. Yanal akış testleri düşük maliyetli, hızlı sonuç veren, kullanımı kolay, hafif ve taşınabilir olduğu için tercih edilmektedir. Genel olarak yanal akış testleri, biyotinlenmiş LAMP amplikonları ile hibridize edilmiş izotiyosiyanat (FITC) etiketli DNA problarında (LAMP amplikonundaki özgül bölgeyi tanıyacak olan) floresan kullanılarak oluşturulmaktadır (105, 106). Bu kompleks, biyotin üzerindeki streptavidin tarafından yakalanarak altın nanopartiküllerin üzerine kaplanmış anti-FITC antikoru ile başka bir kompleks oluşturacaktır. Bu da test hattında görünür bir sonuç vermektedir. Aynı zamanda, biyotinlenmiş hedef olmayan  r n FITC DNA probu ile hibridize olmaz (sadece LAMP amplikonuna özgüdür) veya test hattında streptavidin ile reaksiyona girmek için altın etiketli anti-FITC antikoru ile kompleks oluşturmaz, sinyal üretmez ve test hattında negatif sonuç verir. Yanal akış testinin altın nanopartiküllerle geliştirilmesi, insan patojenlerinin herhangi bir cihaz kullanılmadan görsel olarak tespit edilmesine yardımcı olmaktadır (100).

2.4.3. LAMP Yönteminin Avantajları ve Kısıtlamaları

Dünya Sağlık  rg t 'nün önerdiği üzere ideal bir tanı testi, yüksek duyarlılık ve özgüllük, düşük maliyet, uygulama kolaylığı ve kısa sonuç süresi gibi özellikleri içermelidir (107). Amplifikasyon teknikleri arasında LAMP yöntemi, karmaşık bir tekniğe sahip olmasına karşın, tanı testlerinden istenilen özellikleri potansiyel olarak barındırdığı için öne çıkmaktadır. Yüksek duyarlılık ve özgüllüğün yanında LAMP'ın

sağladığı belki de en önemli avantaj hasta başında kısa sürede tanıya olanak sağlayabilen hızıdır. PZR gibi diğer nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin aksine 30 dakika gibi kısa bir süre içerisinde gerçekleştirilebilir. Bir diğer önemli avantajı, reaksiyonlar sabit bir sıcaklıkta ilerlediğinden termal döngü cihazı gibi gelişmiş cihazlara gereksinimini ortadan kaldırması ve basit bir su banyosu veya ısı bloğu yardımıyla uygulanabilmesidir.

LAMP yöntemi, sonuçların analizi aşamasında basitliği ve çeşitlendirilebilir olmasıyla da avantaja sahiptir. LAMP reaksiyonlarında kullanılan boyalar ister doğal ışık altında olsun ister floresan boya kullanımıyla UV ışığı altında olsun, kolorimetrik değişikliklerin çıplak gözle gözlemlenmesini sağladığından sonuçların doğrudan değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. LAMP amplifikasyonu sırasında alkaliden asidiğe önemli bir pH değişimi gözlemlendiğinden, pH indikatörü boyalar da LAMP reaksiyonunu takip için kullanılabilir ve renk değişimi kolayca gözlemlenebilir (108). Ayrıca LAMP ters transkriptaz kullanarak RNA'yı da yüksek verimlilikle amplifiye edebilmektedir (109). Bu sayede hem DNA hem RNA saptanması amacıyla kullanılabilir. LAMP yöntemi, primer tasarımındaki kompleks doğasından ileri gelen özgüllüğü sayesinde örneklerde hedef olmayan DNA'nın varlığından etkilenmemektedir (110). LAMP testi, kan gibi bazı PZR inhibitörlerine karşı stabildir ve tespit, ekstraksiyon adımı olmadan, işlenmemiş bir örnekle de gerçekleştirilebilir. Bu özellikleri sayesinde LAMP temelli tanı testleri endemik durumlarda bölgeye ulaştırmak için taşınabilir bir tanı aracı haline getirilebilir.

LAMP tekniği yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip güvenilir bir yöntem olmasına karşın sorunsuz bir biçimde uygulanmasına engel olabilecek bazı kısıtlamaları mevcuttur. Reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ürün büyük bir DNA zinciri olduğundan bu teknik klonlama gibi diğer moleküler biyoloji işlemleri için kullanılamaz ve PZR'ye kıyasla daha kısıtlı bir uygulama alanında kalmaktadır (102). Amplifikasyon için doğru ve uygun bir hedef bölge seçmek zordur. Bu bölge ya yüksek oranda korunmuş bir bölge olmalı ya da mikroorganizma türüne özgü bir bölge olmalıdır. Duyarlılık ve özgüllüğü arttırmak için oldukça küçük hedef sekans içinde 6-8 bölgeye özgül 4-6 adet primer tasarlanmaktadır. Primer tasarımı bu nedenle birçok kısıtlamaya maruz kaldığından, LAMP için primer tasarım aşaması karmaşıktır.

Reaksiyonlar için birden fazla primer kullanılması, primer tasarımında dikkat edilmemesi halinde şablonsuz amplifikasyona yol açan primer-primer hibridizasyonu riskini ve buna bağlı yanlış pozitiflik oranını arttırabilmektedir (111). LAMP'ın bir diğer dezavantajı kontaminasyon riskidir. Reaksiyonlar sonrası tespit için uygulanan agaroz jel elektroforezinde olduğu gibi reaksiyon tüplerinin açılmasını gerektiren bir prosedür takip ediliyorsa, LAMP çok küçük miktarlardaki kontaminasyona karşı bile oldukça hassas olduğundan izole bir odada yapılması gerekebilir (112). Son olarak LAMP reaksiyonunun kolorimetrik gözlemi bireyin renk algısına bağlı olduğundan tespitin yalnızca gözle yapıldığı durumlarda sonuçların yorumu öznel olacaktır (113).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul tarafından onaylanmasının (Proje no: GO 22/1201, Karar no: 2022/20-09) ardından Mayıs 2023 ile Mayıs 2024 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışmada kullanılan örnekler, Hacettepe Üniversitesi Hastanelerine başvuran hastalardan rutin tanı testleri dahilinde alınan sürüntü örnekleridir. Bu proje, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Moleküler Mikrobiyoloji Birimi ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

HPV enfeksiyonlarının tanısı ve tedavisi için HPV genotiplendirme testi, Merkez Laboratuvar Moleküler Mikrobiyoloji Biriminde gerçekleştirilmektedir. Rutin tanı amacıyla hastalardan alınan servikal sürüntü örneklerinin Merkez Laboratuvar Moleküler Mikrobiyoloji Biriminde kabulü yapılmakta ve işleme alınmaktadır. Çalışma kapsamında kullanılan örneklerde otomatik nükleik asit izolasyon cihazı (GeneRotex 96, Tianlong Xi'an, China) kullanılarak HPV DNA elde edilmiş ve gerçek zamanlı PZR cihazı (Biorad CFX96, Bio-Rad Laboratories, California, U.S.A) kullanılarak elde edilen sonuçlar yorumlanarak raporlanmıştır.

Araştırmanın yapıldığı tarihlerde laboratuvarında kullanılan tanı kiti (Anyplex™ II HPV28 Detection, Seegene, Güney Kore) ile HPV genotiplendirmesi de yapılmaktadır. Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen sıvı bazlı sitoloji (sure-path veya thin-prep) örneklerinden nükleik asit izolasyonu yapıldıktan sonra bu kit ile 28 farklı HPV tipi için tespit ve genotiplendirme yapılmaktadır. HPV 18 ve HPV 16'nın da dahil olduğu 19 farklı HR HPV (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) tipinin genotiplendirmesi yapılabilmektedir. HR HPV tiplerine ek olarak 9 adet LR HPV (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70) tipinin genotiplendirmesi de yapılabilmektedir. Reaksiyonların tamamlanması için 2 saat 50 dakika gerekmektedir. İlgili virüsler için farklı floresan kanallarından (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670, Quasar 705) sonuçlar değerlendirilmektedir. İşlemlerin tamamı üretici firmaların önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmektedir.

Güncel literatürde, HPV ilişkili malignitelerin büyük bir bölümünden yüksek riskli HPV tiplerinden HPV 16 ve HPV 18'in sorumlu olduğu bildirilmektedir (16). Moleküler Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen örneklerden HPV16 ve HPV18 pozitif olanlar prospektif olarak toplanmıştır. Yukarıda belirtilen tarih aralığında, 288 hastaya ait 288 adet servikal sürüntü örneğinden elde edilen 259 adet HPV 16 ve 29 adet HPV 18 toplanmıştır. Çalışmalarda kullanılmak üzere 94 adet negatif örnek toplanmıştır. Toplanan viral DNA'lar araştırma için işleme alınana kadar Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda -20° C'de muhafaza edilmiştir.

DNA toplanma süreci tamamlandıktan sonra sırayla hedef bölgelere özgül LAMP primer setlerinin tasarlanması, LAMP reaksiyonlarının optimizasyonu, LAMP ürünlerinin farklı yöntemlerle değerlendirilmesi, LAMP yöntemi için minimum tespit sınırının belirlenmesi ve elde edilen verilerin PZR sonuçları ile kıyaslamalı olarak istatistiksel analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2. Viral DNA İzolasyonu

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvar Moleküler Mikrobiyoloji Birimine HPV tanı ve tiplendirilmesi amacıyla gönderilen servikal sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu, otomatik nükleik asit izolasyon cihazında (GeneRotex 96, Tianlong Xi'an, China) üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolasyon ürünleri içerisinde, PZR sonuçlarına göre HPV 16 ve HPV 18 'e ait olanlar çalışmada kullanılmak üzere Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda -20° C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Primerlerin Tasarlanması

Çalışmada, HPV 16 tanımlamak üzere kullanılacak bir set LAMP primeri ve HPV 18 tanımlamak üzere kullanılacak başka bir set LAMP primeri tasarlanmıştır. Primerler tasarlanmadan önce HPV genomundaki bilinen bölgeler için, Temel Yerel Uyum Arama Aracı (BLAST) üzerinden tarama yapılmıştır. Çalışmaya özgün ve özgül primerler tasarlamak amacıyla HPV 16 için genomun L1 bölgesi, HPV 18 için ise genomun E6 bölgesi hedef bölge olarak seçilmiştir.

Primer dizileri tasarlanırken "LAMP Designer Software (OptiGene)" yazılımı kullanılmıştır. Bu aşamada yazılımın araştırmacılara önerdiği, varsayılan parametrelere göre çalışılmıştır. Yazılımın sunduğu alternatif primer setleri her iki HPV tipi için BLAST ile kontrol edilerek araştırmada kullanılmak üzere uygun primer dizileri seçilmiştir. Her bir primer seti FIP, BIP, F3, B3, LF ve LB olmak üzere 6 farklı primer içermektedir. HPV 16 ve HPV 18 tiplerinin tanımlanması için tasarlanan FIP, BIP, F3, B3, LF ve LB primerlerinin dizi bilgileri tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. LAMP primerlerinin hedef bölgeleri ve dizileri

Primer Adı	Hedef Bölge	Dizisi
16_F3	L1	AAGGCTCTGGGTCTACTG
16_B3	L1	CCATGTCGTAGGTACTCCT
16_FIP	L1	CCCTGTGCTCGTTGTAACCAACACCTAGTGGTTCTATGGT
16_BIP	L1	TGGCATTGTGTTGGGGTAACCAATGGCAGCACATAATGACAT
16_LF	L1	TGAATATTTGGGCATCAGAGGT
16_LB	L1	ACTGTTGTTGATACTACACGCA
18_F3	E6	TGGTGTATAGAGACAGTATACC
18_B3	E6	TACTTGTGTTTCTCTGCGTC
18_FIP	E6	TTCTGCTGGATTCAACGGTTTTTCAGACTCTGTGTATGGAGA
18_BIP	E6	TTTCACAACATAGCTGGGCACTGTTGGAGTCGTTTCCTGTC
18_LF	E6	GCACCGCAGGCACCTTAT
18_LB	E6	ATTCGTGCTGCAACCGAG

Primer tasarımı tamamlandıktan sonra, primerlerin sentezi ticari firma tarafından gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen primer dizilerinin sulandırılması aşağıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Primerlerin sulandırılması ve primer stoklarının hazırlanması

Üretici firmadan liyofilize halde temin edilen primerlerin LAMP reaksiyonlarında kullanılabilmesi için üretici firmanın önerisi doğrultusunda steril ve iyonlarından arındırılmış su ile çözünmesi sağlanmıştır. Nihai konsantrasyon tüm primerlerde aynı ve 100 mikromolar (μM) olacak şekilde her primer, üreticinin önerileri doğrultusunda farklı miktarlarda su ile çözülerek stok primer solüsyonları hazırlanmıştır.

3.4. LAMP Reaksiyonlarının Optimizasyonu

Yukarıda belirtildiği üzere hedef bölgenin LAMP reaksiyonları ile çoğaltılması için kalıp virüs DNA'sı ve primer dizileri kullanım için hazır hale getirilmiştir. LAMP reaksiyonlarında gerekli olan diğer bileşenler için ticari olarak temin edilen "OptiGene Isothermal Mastermix" solüsyonu kullanılmıştır. Bu solüsyonun içinde LAMP reaksiyonları için gerekli olan; Bst Polimeraz enzimi, termostabil inorganik pirofosfataz enzimi, optimize reaksiyon tamponu, $MgSO_4$, dNTPs ve ds-DNA'ya bağlanan boya (FAM tespit kanalı) bulunmaktadır. "OptiGene Isothermal Mastermix" solüsyonu liyofilize halde temin edilmiş ve üretici firma önerileri doğrultusunda 2.25 mL steril su ile çözülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. LAMP reaksiyonlarının gerçekleşmesi için gerekli olan tüm içerikler tamamlandıktan sonra LAMP deneylerine geçilmeden önce çalışma rahatlığı sağlamak için stok primerlere ikinci bir dilüsyon uygulanmıştır.

Primerlerin reaksiyonlarda istenen konsantrasyonunu koruyup araştırma boyunca her primeri reaksiyona eşit hacimde ekleyebilmek gibi bir çalışma kolaylığı yakalamak amacıyla tablo 3.2'de sunulduğu şekilde, 100 μM 'lık stok primer solüsyonlarına bir aşama daha saf steril su ile dilüsyon yapılarak farklı konsantrasyonlarda ikincil primer stokları elde edilmiştir.

Tablo 3.2. Stok primer solüsyonlarının ikinci dilüsyon sonucu konsantrasyonları

Primer Adı	Reaksiyonda İstenen Konsantrasyonu (μM)	İkinci Dilüsyon Sonrası Stok Konsantrasyon (μM)
FIP	1,6	40
BIP	1,6	40
F3	0,2	5
B3	0,2	5
LF	0,8	20
LB	0,8	20

Arzu edildiği gibi stok primer konsantrasyonlarının elde edilmesinin ardından deneylere geçilmiştir. Deneyler için tüm LAMP hazırlık işlemleri biyogüvenlik düzey 2 (BGD-2) kabinlerde yapılmıştır. Karışımları dağıtma işlemi dahil tüm basamaklar soğuk blok üzerinde yapılmıştır. Tüpler sıkıca kapatılıp hastalardan izole edilen kalıp

DNA'ları eklemek için ikinci BGD-2 olan kabine geçilmiştir. Her iki primer seti için reaksiyonlarda kullanılan konsantrasyonlar ve hacimler aynıdır. LAMP reaksiyonları için kullanılan deney içerikleri, reaksiyondaki final konsantrasyonları ve reaksiyon hacimleri Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. LAMP reaksiyon içerikleri, reaksiyonda son konsantrasyon ve hacimleri

Reaktifler	Reaksiyonda Son Konsantrasyon (μM)	Hacim (μl)
OptiGene Isothermal Mastermix	1x	15
FIP Primer	1,6	1
BIP Primer	1,6	1
F3 Primer	0,2	1
B3 Primer	0,2	1
LF Primer	0,8	1
LB Primer	0,8	1
Kalıp DNA	Değişken	4
Toplam		25

Tüm deneylerde kontaminasyon kontrolü için negatif kontrol ve reaksiyon kontrolü için pozitif kontrol tüpleri test edilmiştir. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra tüpler 65° C sabit sıcaklıkta 30 dakika tutulmuştur. Bu esnada herhangi bir ısı döngü işlemi uygulanmamıştır. 30 dakikanın sonunda tüpler oda sıcaklığına alınmıştır. Süre sonunda hedeflenen gen bölgesine ait ürünler elde edilmiş ve reaksiyon ürünlerinin tespiti aşamasına geçilmiştir.

3.5. LAMP Reaksiyon Ürünlerinin Tespiti

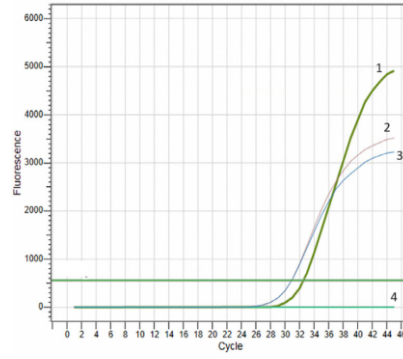
LAMP amplifikasyon yöntemi, reaksiyonlar sonunda amplifikasyon ürünlerinin tespiti aşamasında farklı yöntemler kullanılabilmesine olanak sağlar. Bu çalışmada reaksiyonların bitiminde elde edilen ürünlerin tespiti amacıyla birden fazla yöntem denenmiştir. Bu yöntemler; Gerçek Zamanlı PZR cihazında FAM floresan ışıma kanalından tespit, reaksiyon ürünlerinin yanıl akış şeridinde yakalanarak görsel olarak tespiti ve DNA'ya bağlanan bir boya olan Sybr Green ile görsel olarak tespitini içermektedir. Amplifikasyon ürünlerinin tamamı gerçek zamanlı PZR cihazında FAM floresan kanalından tespit esasıyla çalışılmıştır. Sybr Green boyası ve yanıl akış şeridi ile tespit kısıtlı malzeme nedeniyle az sayıda örnek için denenebilmiştir. Bu nedenle

bu yöntemlerle ilişkili istatistiki bir veri sunulmayacaktır. Ancak LAMP yönteminin güçlü yönlerinden biri olan tespit aşamasının çeşitliliğini ve cihazdan bağımsızlığını vurgulamak amacıyla denenmiş örneklerle ait sonuç görsellerine yer verilecektir.

3.5.1. Gerçek Zamanlı PZR Cihazı ile Tespit

Gerçek zamanlı PZR cihazları, PZR’de amplifikasyonun gerçek zamanlı olarak takip ve tespit edilmesine olanak sağlar. Bu amaçla, çoğaltılan DNA’ya bağlanarak cihazın tespit edebileceği belli dalga boylarında ışımlar yapan floresan maddeler kullanılmaktadır. Klasik olarak, çoğaltılan DNA sayısı arttıkça floresan ışımının şiddeti de artmakta ve bu sinyal artışı cihaz ekranından gerçek zamanlı olarak takip edilebilmektedir. Bu çalışma kapsamında LAMP reaksiyon sonuçlarının değerlendirilmesi için PZR cihazının termal döngü protokolü, cihazın tüm döngüler boyunca 65° C sabit sıcaklıkta kalarak her 45 saniyede bir floresan ışımayı ölçecek şekilde okuma yapması için programlandı. Toplamda 30 döngü yani 30 dakika sonunda reaksiyon sonlandırıldı.

Bu çalışma için LAMP reaksiyonlarında kullanılan ‘OptiGene Isothermal Mastermix’ içerisinde, çift zincirli DNA’ya bağlanarak gerçek zamanlı PZR cihazının FAM kanalından okunabilecek ışımaya yapan floresan madde bulunmaktadır. Reaksiyon havuzundaki çift zincirli DNA miktarı arttıkça ışımının şiddeti artmakta ve bu sayede LAMP reaksiyonu gerçek zamanlı olarak takip edilebilmektedir. Döngü eşik değerine bakılmaksızın, sigmoidal eğrinin görüldüğü reaksiyonlar pozitif, floresan şiddetinde herhangi bir değişiklik olmadan tabanda düz çizgi şeklinde görülen reaksiyonlar negatif olarak yorumlanmıştır. Şekil 3.1 eğrilerin negatif reaksiyon ve pozitif reaksiyon olarak temsilini göstermektedir. 1, 2 ve 3 numaralı eğri ve benzeri sigmoidal eğriler pozitif kabul edilirken, 4 numaralı eğri ve benzerleri negatif kabul edilmiştir.



Şekil 3.1. Gerçek zamanlı PZR cihazından elde edilen görsellerin yorumu

3.5.2. Yanal Akış Şeridi ile Tespit

İlgili reaktifler kullanılarak yapılan deneylerde normal LAMP reaksiyonlarından farklı olarak FIP primerleri biotin ile işaretli, FLP primerleri ise FAM ile işaretli olarak sipariş edilmiş (Oligomer LTD.) ve reaksiyonda işaretli primerlerin yerine eklenerek kullanılmıştır. LAMP reaksiyonlarının görsel olarak doğrulanması için yapılan analizlerde kontrol çizgisinde anti-FAM/FITC antikorunun sentezlendiği canlıya ait karşı antikor (IgG), test çizgisinde ise streptavidin bulunan ‘HybriDetect’ (Milenia Biotec, Giessen, Almanya) isimli test çubukları kullanılmıştır.

Yapılan deneylerde bitmiş, pozitif olması halinde biotin ve FAM ile hibridize olan DNA moleküllerini içeren LAMP reaksiyonu (25 µL) üzerinde anti-FAM/FITC antikorlu bulunan altın nanopartikülleri (15-50 nm) içeren taraf solüsyona denk gelecek şekilde HybriDetect çubuklarının üzerine damlatılmış ve reaksiyon sıvı emme pedine ulaşana kadar beklenmiştir. Yüklemin yapıldığı tarafa yakın olan hat test hattını ikinci hat ise kontrol hattını temsil etmektedir. Şekil 4.1’de gösterildiği üzere, yalnızca kontrol hattında çizgi oluşumunun gözlenmesi negatif sonuç, hem test hattı hem kontrol hattında çizgi oluşumu ise pozitif olarak yorumlanmıştır. Bu deneylerde 2’şer adet HPV 16 ve 18 pozitif numuneyle 1 adet negatif kontrol kullanılmıştır.

3.5.3. Sybr Green Boyası ile Tespit

LAMP reaksiyon ürünlerinin görsel olarak tespit edilmesi amacıyla, özgül olmayan DNA boyalarından olan Sybr Green kullanılmıştır. Normalde turuncu renkli

olan boyanın DNA'ya bağlanmasıyla yeşil renge dönmesi ve UV ışık altında verdiği floresan ışıma tespit edilmeye çalışılmıştır. LAMP reaksiyonlarına önceden eklenmesi durumunda reaksiyona inhibitör etki gösterebildiği bilindiğinden Sybr Green ile muamele amplifikasyon basamağından sonra yapılmıştır.

10.000X konsantrasyonda temin edilen Sybr Green boyası, LAMP reaksiyonları son ürünlerine 2 µl hacimde eklenmiştir. Reaksiyon tüpündeki renk değişiminin varlığı veya yokluğu çıplak gözle gözlenmiştir. Ayrıca floresan ışımanın tespiti amacıyla UV ışık altında incelenmiştir. Şekil 4.2'de gösterildiği şekilde, yeşil renk değişimi ve UV altında floresan verme pozitif reaksiyon, renk değişimi veya UV floresan ışıma olmaması negatif reaksiyon olarak yorumlanmıştır. Bu deneylerde 10 adet HPV 16 pozitif örnek, 5 adet HPV 18 pozitif örnek ve 2 adet negatif kontrol kullanılmıştır.

3.6. LAMP Yöntemiyle Tespit Edilebilecek Minimum Virüs Miktarı

LAMP yöntemi ile tespit edilebilen minimum virüs miktarını veya bir başka deyişle tespit alt limitini hesaplamak amacıyla, Moleküler Tanıda Dış Kalite Kontrol (MOTAKK, Ankara, Türkiye) firmasından, içeriğindeki miktarı bilinen HPV DNA standart ürünü (NIBSC, Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG, UK. NIBSC Ürün kodu: 19/224) temin edilmiştir. Üretici önerileri doğrultusunda kullanıma hazır hale getirilen ürün final konsantrasyon olarak HPV 16 ve HPV 18 genotiplerinin her biri için 1×10^7 IU/mL miktarında DNA içermektedir.

1×10^7 IU/mL konsantrasyonda DNA içeren ilk solüsyonun elde edilmesinin ardından 1/10'luk seri dilüsyonlar ile DNA konsantrasyonu giderek azaltılmış ve test edilecek en düşük DNA konsantrasyonu olarak 1 IU/mL kullanılmıştır. Kontaminasyon kontrolü amacıyla negatif örnek kullanılmıştır. Giderek azalan konsantrasyonlarda HPV virüslerini içeren bu örnekler ve negatif kontrol örneği, araştırmada çalışılan diğer örneklerle aynı prosedürde reaksiyonlara eklenerek yöntemin tespit edebildiği en düşük DNA miktarı anlaşılmaya çalışılmıştır.

3.7. Direkt Klinik Örnek Kullanımı

DNA izolasyonu basamağı atlanarak reaksiyonlarda direkt klinik örnek kullanımının sonuçlarını incelemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, test sonucu bilinen 5 adet HPV 16 pozitif klinik örnek ve 5 adet HPV 18 pozitif klinik örnek, izolasyona tabi tutulan diğer örneklerle aynı hacimde (4 µl), DNA izolasyonuna tabi tutulmaksızın reaksiyonlara eklenmiştir. Reaksiyonlardaki diğer reaktiflerin hacim ve konsantrasyonları ile reaksiyonlar için oluşturulan protokole bir değişiklik yapılmamıştır. Reaksiyon sonu ürünlerin değerlendirilmesi gerçek zamanlı PZR cihazıyla yapılmıştır. Reaksiyonlarda pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır.

3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmada reaksiyon sonucunun değerlendirilmesi amacıyla bazı örnekler için birden fazla tespit yöntemi kullanılmıştır. Ancak istatistiksel analizler için kümülatif veri gerçek zamanlı PZR cihazlarından elde edilen sonuçlara dayanmaktadır. Bu çalışmada istatistiksel analizlerde MedCalc's (114) paket programlarından faydalanılmıştır. Altın standart test olarak PZR testi kullanılırken, tanı testleri olarak LAMP testinin performans değerlendirmesinde ise duyarlılık, özgüllük, pozitif olabilirlik oranı ve negatif olabilirlik oranları kullanılmıştır. Her iki veri arasındaki uyumun değerlendirilmesi için de Kappa skorları incelenmiştir. Analiz boyunca anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ alınmıştır.

Örneklem büyüklüğü hesaplaması

Hastalık durumunun ve yaygınlığının bilindiğinde yeni bir tanı testinin değerlendirildiği prospektif çalışmaların ilk aşamalarında çalışmaya dahil edilecek örneklemin büyüklüğü hesaplanır. Yeni tanı testinin duyarlılık ve özgüllük performansının araştırıldığı bu çalışmalarda önceden belirlenen duyarlılık ve özgüllük değerlerinin %95 güven düzeyinde d değeri kadar hata payı aralığında kalması arzulanır. Duyarlılık ve özgüllük değerleri bir oran belirttiği için hastalık durumunun bilindiği durumlar için örneklem büyüklüğü formülü aşağıdaki gibi verilmiştir (115).

$$n = \frac{Z_{\frac{\alpha}{2}}^2 \hat{P} (1 - \hat{P})}{d^2}$$

Çalışma öncesinde belirlenen duyarlılık ve özgüllük değeri $\hat{P}$ ile gösterilmiştir. Duyarlılık ve özgüllük değerleri literatürde yer alan önceki çalışmalarla veya uzman deneyimleriyle de belirlenebilmektedir. Zhang ve ark.'larının çalışmasından (116) hareketle duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla %94 ve %100 alınmıştır. d ise hata payını ifade etmektedir ve bu çalışmada d=0.05 olarak alınmıştır. Son olarak $\alpha=0.05$ için $Z_{\frac{\alpha}{2}}$ ise 1.96 değeri kullanılmıştır. Buradan hareketle örneklem büyüklüğü en az 86 olacak şekilde belirlenmiştir. Fakat analizlerin gücünü arttırmak için örneklem büyüklüğü 86 ile sınırlı tutulmayıp fazladan örnek eklenmiştir.

Doğruluk oranı

Tanı testinin bir hastanın hastalık durumunu doğru şekilde sınıflandırma olasılığı doğruluk oranı ile ifade edilir. Doğruluk oranının 1'e yakın olması ilgili testin başarısının o kadar yüksek olduğu anlamına gelmektedir (117). Bu oran aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\text{Doğruluk Oranı} = \text{Duyarlılık} \times \text{Prevalans} + \text{Özgüllük} \times (1 - \text{Prevalans})$$

Prevalans

Belirli bir zaman içerisinde belirli bir toplumda ilgili hastalığın görülme sıklığına prevalans denir. Kolaylıkla, toplumdaki hasta sayısının risk altındaki toplam nüfus sayısına oranı ile hesaplanabilmektedir.

Bu tez çalışmasında kullanılan prevalans değerleri için Gultekin ve ark.'larının (16) 1 milyondan fazla kadın katılımcı üzerinde yaptıkları araştırma esas alınmıştır. Katılımcılardan alınan örneklerin %3.5'inin HPV test sonuçlarının pozitif çıktığı görülmüştür. Test sonucu pozitif çıkan bireylerin ise %20.7'sinde HPV 16 ve %5.1'inde ise HPV 18 test sonucunun pozitif olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada HPV 16 için uygulanan testlerin performans analizinde prevalans değeri

olarak %0,7245 kullanılırken, HPV 18 için uygulanan testlerin performans analizinde ise prevalans değeri olarak %0,1785 değeri kullanılmıştır.



4. BULGULAR

Bu araştırmada HPV 16 ve HPV 18 tespit edilen örneklerden geriye dönük olarak örnek sahiplerine ait klinik veya demografik bilgi toplanmamıştır. Dolayısıyla araştırma sonucu elde edilen bulgular, servikal sürüntü örneklerinde HPV 16 veya HPV 18'e sahip hastaların klinik özellikleri ve yaş veya cinsiyet gibi demografik özelliklerinden bağımsız olarak elde edilmiştir. Bulgular arasında; gerçek zamanlı PZR sonuçları referans kabul edilerek yöntemin analitik performansına dair istatistiki analiz sonuçları, HPV 16 veya HPV 18 tipleri için ayrı ayrı tasarlanan LAMP yönteminin tespit edebileceği minimum virüs miktarı, tespit aşamasında farklı görsel yorumlama yöntemlerinin kullanımına ilişkin bulgular, izolasyon basamağı olmaksızın doğrudan klinik örnek kullanımının sonuçları yer almaktadır.

4.1. HPV 16 ve 18 Tespitinde LAMP Yönteminin Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Bu bölümde HPV 16 ve HPV 18 tespiti ve tiplendirmesi için PZR test sonuçları referans olarak kabul edildiğinde, LAMP yönteminin etkinliğinin değerlendirilmesine yer verilmiştir.

4.1.1. HPV 16 Tespitinde LAMP Yönteminin Etkinliği

Bu çalışma kapsamında HPV 16 saptanması için referans test olan PZR sonuçlarına göre 284 farklı örneğin 259 (%91)'unda HPV 16 tespit edilirken 25 (%9)'inde ise tespit edilememiştir. 259 adet örnek HPV 16 olduğu bilinen örnekler olarak kullanılmıştır. Referans test sonucu HPV 16 için negatif olan 25 adet örnek diğer HPV türlerinden bazılarını içerebilir veya tamamen negatif olabilir. Aynı örnekler üzerinde HPV 16 için LAMP yöntemi uygulandığında test sonuçlarının dağılımını tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Referans teste göre HPV 16 için LAMP testi sonuçlarının dağılımı

		Referans Test Sonucu		
		Test Pozitif (T+)	Test Negatif (T-)	TOPLAM
LAMP Testi Sonucu	Test Pozitif (T+)	252	0	252
	Test Negatif (T-)	7	25	32
TOPLAM		259	25	284

Tablo 4.2.'de test sonucuna ilişkin farklı istatistiklere göre test performans metriklerine yer verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre HPV 16 için LAMP tanı testi 284 örneğin 277'sini doğru sınıflandırmıştır. Teste ilişkin duyarlılık oranının %97, özgüllük oranının ise %100 olduğu tespit edilmiştir. Özgüllük değeri %100 olduğu için pozitif olabilirlik oranı düzgün bir şekilde hesaplanamamaktadır. Negatif olabilirlik oranı ise 0,03 olarak kestirilmiştir. Tanı testinin doğruluk oranı incelendiğinde testin %99,98 oranında pozitif örnekleri doğru sınıflandırdığı tespit edilmiştir. Ek olarak pozitif ve negatif prediktif değerleri incelendiğinde her iki değer de %99,98 olduğu görülmüştür.

Tablo 4.2. HPV 16 için LAMP tanı testinin analiz sonuçları

İstatistik	Değer	95% Güven Aralığı
Duyarlılık	97%	94,51% - 98,91%
Özgüllük	100%	86,28% - 100,00%
HPV 16 Prevalansı (*)	0,72%	
Pozitif Prediktif Değer (*)	100%	98,55% - 100,00%
Negatif Prediktif Değer (*)	99,98%	99,96% - 99,99%
Doğruluk Oranı (*)	99,98%	

(*) Bu değerler HPV 16 enfeksiyonu prevalansına bağımlı olarak hesaplanmıştır.

4.1.2. HPV 18 Tespitinde LAMP Yönteminin Etkinliği

HPV 18 tespitinde LAMP yönteminin etkinliğinin araştırıldığı çalışmada toplamda 98 örnek kullanılmıştır. HPV 18 tespitinde PZR test sonuçları referans test olarak kullanıldığında 29 örnekte HPV 18 varlığı tespit edilirken 69 örnekte HPV 18

tespit edilmemiştir. Tablo 4.3.'te ise LAMP yönteminin HPV 18 için sonuç dağılımına yer verilmiştir.

Tablo 4.3. Referans teste göre HPV 18 için LAMP testi sonuçlarının dağılımı

		Referans Test Sonucu		
		Test Pozitif (T+)	Test Negatif (T-)	TOPLAM
LAMP Testi	Test Pozitif (T+)	25	6	31
Sonucu	Test Negatif (T-)	4	63	67
TOPLAM		29	69	98

Tablo 4.4.'te HPV 18 tespiti için LAMP yönteminin farklı metriklerde performans kriterlerine yer verilmiştir. İlgili tanı testinin duyarlılığının %86, özgüllüğünün ise %91 olduğu görülmüştür. Pozitif ve negatif olabilirlik oranları ise 9,91 ve 0,15'tir. Pozitif olabilirlik oranının 9,91 olması her 95 pozitif sonuç için 86 doğru pozitif ve 9 tane yanlış pozitif verdiğini göstermektedir. Tanı testinin doğruluk oranı incelendiğinde ise testin %91 oranında pozitif örneklerin durumunu doğru sınıflandırdığı görülmüştür. Son olarak HPV 18 için LAMP yönteminin pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %1,71 ve %99,97 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. HPV 18 için LAMP tanı testinin analiz sonuçları

İstatistik	Değer	95% Güven Aralığı
Duyarlılık	86%	68,34% - 96,11%
Özgüllük	91%	82,03% - 96,74%
HPV 18 Prevalansı (*)	0,18%	
Pozitif Prediktif Değeri (*)	1,71%	0,79% - 3,65%
Negatif Prediktif Değeri (*)	99,97%	99,93% - 99,99%
Doğruluk Oranı (*)	91%	83,87% - 96,04%

(*) Bu değerler HPV 18 enfeksiyonu prevalansına bağımlı olarak hesaplanmıştır.

4.2. LAMP Yönteminin Tespit Edebileceği Minimum Virüs Miktarı

LAMP yönteminin HPV 16 ve HPV 18 virüsleri için tespit edebileceği minimum virüs miktarını değerlendirmek amacıyla içeriğindeki DNA konsantrasyonu bilinen standart kalite kontrol örneği kullanılmıştır. Her iki genotip için de 1×10^4 IU/mL konsantrasyonda DNA içeren standart numuneye 1/10'luk seri dilüsyonlar

yapılarak DNA konsantrasyonu giderek azaltılmıştır. Test edilen en düşük DNA konsantrasyonu olarak 1 IU/mL kullanılmıştır. Giderek azalan konsantrasyonlarda HPV 16 ve 18 genotiplerini içeren bu örnekler ve negatif örnek, araştırmada çalışılan diğer örneklerle aynı prosedür ve hacimde LAMP reaksiyonlarına eklenmiştir. Sonuçlar gerçek zamanlı PZR cihazından yorumlanmıştır.

LAMP yönteminin HPV 16 tespitindeki limitini saptamak amacıyla yapılan deneylerde negatif kontrol kuyucuğunda herhangi bir floresan ışımaya olmamıştır. 1×10^4 IU/mL konsantrasyondan itibaren 10 IU/mL konsantrasyona kadar olan bütün kuyucuklarda pozitif reaksiyon görülmüştür. 1 IU/mL konsantrasyondaki örneğin olduğu kuyucukta herhangi bir floresan ışımaya olmamıştır. Yöntemin HPV 18 tespitindeki limitini saptamak amacıyla uygulanan reaksiyonlarda negatif kontrol örneğine ait kuyucukta herhangi bir floresan ışımaya saptanmamıştır. 1×10^4 IU/mL konsantrasyondan itibaren 10 IU/mL konsantrasyona kadar olan bütün kuyucuklarda pozitif reaksiyon görülmüştür. 1 IU/mL konsantrasyondaki örneğin olduğu kuyucukta herhangi bir floresan ışımaya olmamıştır. Bu sonuçlara göre, LAMP yönteminin HPV 16 ve 18 genotiplerinin her ikisi için tespit alt limiti 10 IU/mL olarak belirlenmiştir.

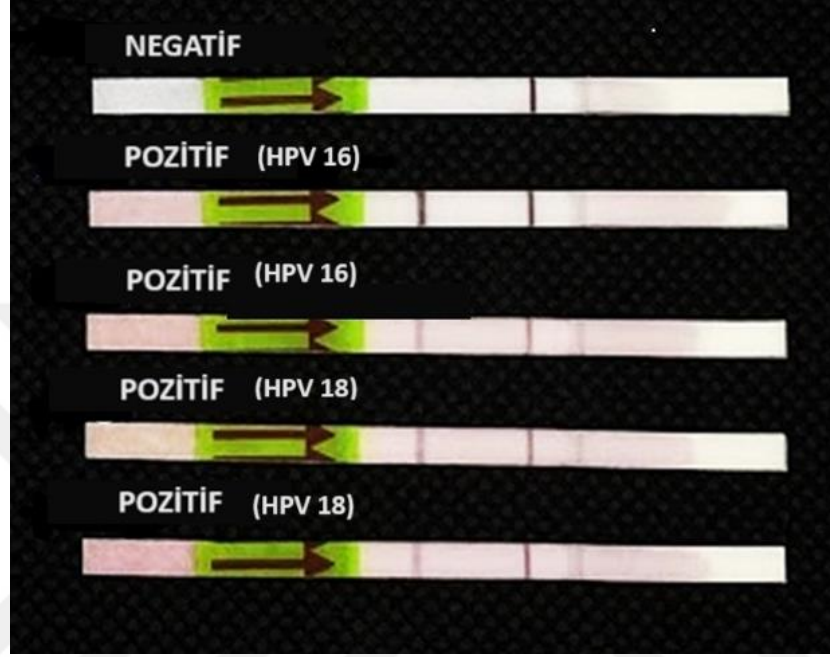
4.3. Reaksiyon Ürünlerinin Tespitinde Görsel Yöntemlerin Kullanımı

LAMP reaksiyonlarının sona ermesinin ardından reaksiyon tüpündeki son ürünlerin görsel olarak tespiti amacıyla Sybr Green boyası ile renk değişikliğinin izlenmesi ve ürünlerin yanal akış şeridinde yakalanarak gösterilmesi olmak üzere iki farklı yöntem denenmiştir.

4.3.1. Reaksiyon Ürünlerinin Yanal Akış Şeridi ile Tespiti

LAMP yöntemine ait son ürünlerin yanal akış şeritlerinde yakalanarak görselleştirilmesi amacıyla 1 adet negatif örnek ve 4 adet pozitif örnek kullanılmıştır. Örneklerle ait LAMP reaksiyon ürünü şeritlerin üzerine damlatılmış, sıvının ok yönünde ilerleyişi görülüp sonlanma noktasındaki emme pedine ulaşıncaya kadar beklenmiştir. Daha sonra yanal akış şeritleri düz koyu renk bir zemin üzerinde değerlendirilmiştir. Yükleme yapıldığı tarafa yakın olan hat test hattını, ikinci hat

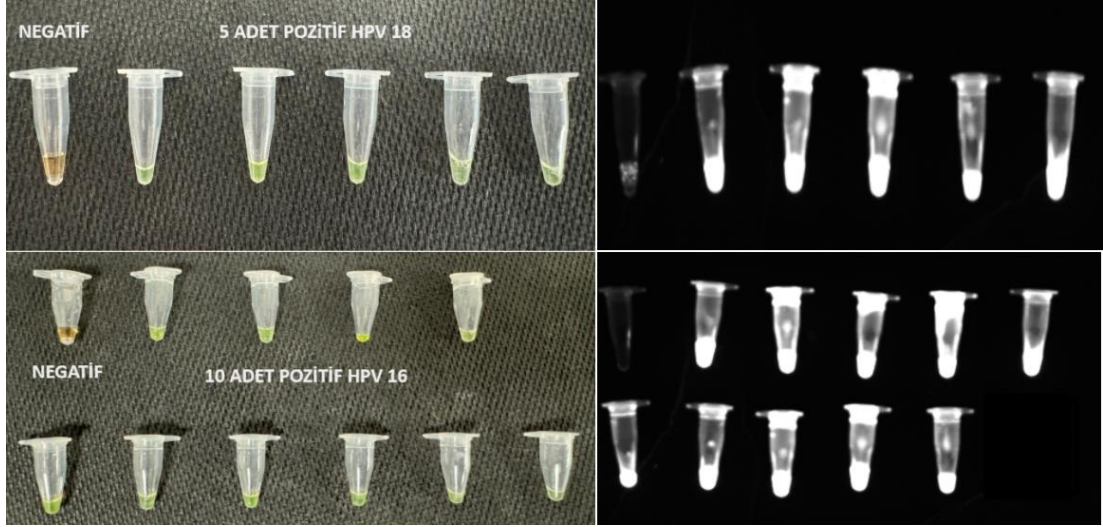
ise kontrol hattını temsil etmektedir. Negatif kontrol amaçlı kullanılan örnekte yalnızca kontrol hattında renk değişimi görülürken, dört pozitif örneğin şeritlerinde hem test hem de kontrol hattında renk değişimi gözlenmiştir. Örneklerin yanıl akış şeritlerinde oluşturdıkları görseller şekil 4.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. LAMP reaksiyon ürünlerinin yanıl akış şeridinde tespiti

4.3.2. Reaksiyon Ürünlerinin Sybr Green Boyası ile Tespiti

LAMP yöntemine ait son ürünlerin reaksiyon sonrasında Sybr Green boyası ile muamele edilerek renk değişiminin görselleştirilmesi amacıyla 10 adet HPV 16 pozitif örnek, 5 adet HPV 18 pozitif örnek ve 2 adet negatif örnek kullanılmıştır. Örneklerle ait LAMP reaksiyon ürününe Sybr Green eklenerek renk değişiminin ve UV altında floresan ışımının varlığı düz koyu renk bir zemin üzerinde incelenmiştir. Negatif örneklerde boyanın eklenmesinin ardından reaksiyon tüpünün rengi turuncu renkte gözlenirken, pozitif örnekler boyanın eklenmesiyle yeşil renkte gözlenmiştir. UV altında yapılan incelemede negatif örneklerde herhangi bir floresan ışımaya olmazken, pozitif örneklerde floresan ışımaya görülmüştür. Örneklerin üzerine Sybr Green eklenmesiyle meydana gelişen renk değişimi ve UV altındaki floresan ışımaya ilişkin görseller şekil 4.2’de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Reaksiyon sonunda Sybr Green eklenmesiyle gözlenen renk değişikliği (solda) ve UV altında floresan ışıma (sağda)

4.4. LAMP Yönteminin Klinik Örneğe Doğrudan Uygulanması

LAMP yöntemi ile DNA amplifikasyonunun farklı mikroorganizmalar ve farklı örnek türleri için DNA izolasyon basamağı olmaksızın direkt klinik örnekten sağlanabileceğine dair araştırmalar literatürde mevcuttur. Araştırmada kullandığımız reaktifler ve protokol ile direkt klinik örnekten HR HPV tespitinin mümkün olup olmadığını anlamak amacıyla, reaksiyonlar için gerekli diğer koşulların tamamı sabit tutularak, direkt klinik örnekler reaksiyon havuzuna DNA izolasyonu yapılmaksızın eklenmiştir. Reaksiyon sonrası ürünlerin tespitinde gerçek zamanlı PZR cihazı kullanılmıştır. HPV 16 pozitif olduğu bilinen 5 adet direkt klinik örnekten 4 tanesi ve HPV 18 pozitif olduğu bilinen 5 adet direkt klinik örnekten de 4 tanesi bu şekilde pozitif olarak saptanabilmektedir.

5. TARTIŞMA

Rahim ağzı kanseri dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu kanser, gelişmekte olan ve geri kalmış ülkelerde kadınların kansere bağlı ölüm sebepleri içerisinde ön sıralarda yer almaktadır. Bu kansere sebebiyet veren etkenlere bakıldığında etiyolojik olarak sebep, neredeyse %100'e varan oranlarda İnsan Papilloma Virüslerinin yüksek riskli tipleriyle enfekte olmaktır. HPV'lerin cinsel yolla bulaşan tüm etkenler içerisinde en ön sırada olduğu gerçeğiyle beraber düşünüldüğünde, HPV enfeksiyonları ve rahim ağzı kanseriyle küresel çapta bir mücadele gerekliliği görülmektedir.

Bir kanser tipiyle bir virüs enfeksiyonunun bu seviye nedensellik göstermesi virüse karşı uygulanacak doğru aşılama ve tarama programlarıyla rahim ağzı kanseri insidansının düşürülebileceğini düşündürmektedir. Bireylerin cinsel olarak aktifleşmesinden önce yüksek riskli HPV tiplerine karşı aşılama bu kanser ve ilişkili ölümlerin engellenmesi için kritik bir konumda bulunmaktadır. HPV aşısı ülkemizde rutin aşı takviminde bulunmamaktadır ve isteyen bireyler kendi imkanları dahilinde bu aşığı olabilmektedir. Ancak aşılanabilenlerin oranları istenilen seviyelerde değildir.

Yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyonun ardından kanser tablosunun gelişmesi için 5 ile 10 yıl arasında bir süre gerektiği bilinmektedir (13). Bu süre nedeniyle, rahim ağzı kanseriyle mücadelede aşılama ek olarak bir diğer önemli unsur ise toplumda risk altında bulunan bireylerin taranmasıdır. Ülkemizde bu bağlamda 2014 yılından beri HPV DNA bazlı tarama programı uygulanmaktadır. Risk altındaki kadınlardan alınan servikal sürüntü örneklerinde yüksek riskli HPV DNA varlığı araştırılmaktadır. Bu test gerçek zamanlı PZR testidir. PZR testleri büyük merkezlerde yaygın olarak kullanılan, yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip testlerdir. Ancak imkanların daha kısıtlı olduğu bölgelere ulaşımı konusunda sorunlar vardır. Sonuçları değerlendirecek eğitimli personel, karmaşık ve pahalı ekipmanlar gibi gereklilikleri bu hizmetin görece küçük bölgelere ulaşımında aksamalar yaratmaktadır.

LAMP yöntemi, PZR'ye kıyasla daha az olan alt yapı gereksinimleri sebebiyle hasta başı testlerin geliştirilmesinde, bu testlere nükleik asit tespiti düzeyinde özgüllük kazandırmak amacıyla tanıtıldığı günden bu yana çeşitli mikroorganizmaların tespiti için yoğun olarak çalışılmaktadır. Bu yöntem sonucu elde edilen amplifikasyon ürünlerinin tespiti aşamasında görsel sonuç almak mümkün olmakta ve bu sayede karmaşık laboratuvar ekipmanı bağımlılığı, uzun süren sonuç alma süreleri gibi zorluklar aşılabilmektedir. Tanısal performansı yeterli olan LAMP yöntemi temelli bir tarama testinin kliniklerde mevcut olması, HR HPV tiplerine bağlı gelişen servikal kanserle mücadelede erken tanı ve tedaviye ulaşabilen hasta sayısını arttıracaktır.

Bu tezin amacı laboratuvarda tasarladığımız LAMP yönteminin, ülkemizde en sık görülen yüksek riskli HPV tipleri olan HPV 16 ve HPV 18 tespiti için referans yöntemine göre yeterliliğini değerlendirmektir. Yüksek riskli HPV DNA varlığının yüksek özgüllük ve duyarlılık ile taranmasının, laboratuvarı bağımsızlaştırarak daha küçük bölgelere, hastanın bakım aldığı odaya, poliklinik şartlarına kadar taşınabilmesi ümit edilmektedir. Daha hızlı sonuç süreleri elde edilmesi ve daha küçük bölgelere ulaşım sayesinde test uygulanabilen birey sayısının artmasının toplum sağlığını iyileştirici etkileri olacaktır.

Araştırma sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde LAMP yönteminin HPV 16 tespiti için duyarlılığı %97, özgüllüğü ise %100 olarak tespit edilmiştir. Test, altın standart olarak kullanılan PZR testine göre pozitif olan 259 örneğin %97'sini doğru bir şekilde saptarken, PZR testine göre negatif 25 örneğin ise tamamını negatif olarak doğru bir şekilde saptamıştır. Negatif olabilirlik oranının sıfıra çok yakın olması (0,03) referans test sonucu negatif olan örneklerin tespitinde çok başarılı olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak pozitif ve negatif prediktif değerlerinin %100 olması da HPV 16 için LAMP tanı testinin sonuçlarının başarılı olduğunu göstermektedir.

HPV 18 tespiti için LAMP testi sonuçları incelendiğinde ise, LAMP testinin pozitif örnekleri %86 oranında doğru bir şekilde saptayabilirken, referans testle negatif sonuç alınan örneklerin ise %91'ini doğru bir şekilde tespit ettiği görülmüştür.

Toplamda ise örneklerin %91'inde altın standart yöntemle karşılaştırıldığında doğru sonuç alındığı görülmüştür.

HPV 16 ve HPV 18 için ayrı ayrı tasarlanan LAMP tanı testlerinin birbirleriyle karşılaştırılması yapıldığında, LAMP yönteminin HPV 16 için duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %97 ve %100 iken, HPV 18 için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %86 ve %91 olarak saptanmıştır. LAMP yönteminin HPV 16 ve HPV 18 saptanmasında doğruluk oranları ise sırasıyla %99,98 ve %91 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, negatif ve pozitif örneklerin doğru tespiti konusunda HPV 16 için geliştirilen LAMP yönteminin performansının HPV 18 için geliştirilen LAMP testine göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Çalışmada, LAMP reaksiyon ürünlerinin tespit edilmesinde görsel sonuç veren yöntemlerin uygulanan protokole uygunluğu araştırılmıştır. Bu amaçla daha önceden sonucu bilinen 4 adet pozitif ve 1 adet negatif örneğe ait LAMP reaksiyon ürünü yanal akış şeridine damlatılmıştır. Ayrıca önceden sonucu bilinen 10 adet HPV 16 ve 5 adet HPV 18 ve 2 adet negatif örneğe ait LAMP reaksiyon ürünü Sybr Green ile muamele edilerek renk değişikliğinin varlığı gözlenmiştir. Her iki yöntem ile pozitif veya negatif kararı vermenin mümkün olduğu gösterilmiştir. Ancak böyle görsel sonuç alınan yöntemlerde karşılaşılabilen bazı sorunlar olduğu bilinmektedir. İşlem uygulandıktan sonra değerlendirme öncesi bekleme süresinin uzaması elde edilen sonuçların yorumunu etkileyebilmektedir. Ayrıca renk algısı kişiden kişiye değişebildiği için sonuçlar öznel olmaktadır.

Mevcut literatürde LAMP amplifikasyon yöntemini farklı tespit metotları ile birleştirerek HPV DNA varlığını tespit ve genotiplendirme amacıyla kullanan çeşitli yayınlar vardır. Bu yayınların ortak amacı LAMP izotermal amplifikasyonunu HR HPV tespitinde yüksek özgüllük ve duyarlılık ile kullanılabilecek hale getirmektir. Çalışmaların kurgusu, çalışılan örnek sayısı ve tipi, reaksiyon süreleri, son ürünleri tespit etmekte kullanılan metotlar, referans olarak alınan yöntemler ve testlerin performansına ilişkin elde edilen veriler araştırmalar arasında farklılık göstermektedir.

Literatüre bakıldığında, sabit bir sıcaklık altında hedef bölgenin verimli bir şekilde çoğaltılması için gereken sürenin tasarlanan primer setlerine ve varlığı araştırılan HPV tipine göre değişebildiği görülmektedir. Bu süre farklı yayınlarda ortalama 20 ile 60 dakika arasında değişmekte olup, büyük çoğunlukla 45 dakikanın altındadır (116). Çalışmamızda da literatüre benzer şekilde HPV 16 ve HPV 18 tiplerinin hedef bölgelerinin çoğaltılabilmesi için 30 dakikalık reaksiyon süresi yeterli olmuştur.

HPV 16 ve HPV 18 tespiti için geliştirilen LAMP yöntemlerinin tanısal performansına bakıldığında, literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu şekilde son derece yüksek özgüllüğe (HPV 16 ve 18 için sırasıyla %100 ve %91) sahip oldukları görülmektedir (116, 118, 119). Bu yüksek özgüllüğün, yöntemin doğasından ileri gelen, hedef bölgeye bağlanacak primer sayısının fazla olmasından kaynaklandığı ve sağlıklı bir şekilde çalışan tüm primer setleri için sağlanabileceği düşünülebilir. HPV 18 tespitindeki görece özgüllük düşüşü, araştırmadaki HPV 18 örnek sayısının azlığı, referans yöntem olarak kullanılan PZR testinin bazı örnekler için yanlış negatifliği ya da E6 hedef gen bölgesi için tasarlanan primerlerin performansından kaynaklanmış olabilir.

Her iki virüs tipi için yöntemin duyarlılığına bakıldığında HPV 16 ve 18 için sırasıyla %97 ve %86 olduğu görülmüştür. LAMP yönteminin duyarlılığı literatürdeki benzer yayınlarda da yüksek çıkmaktadır. Farklı çalışmalarda farklı oranlar sunulmuştur ve bu çalışmadaki sonuçların genel itibarıyla HPV 16 ve HPV 18 genotipleri için literatürdekilere benzer olduğu görülmüştür (119, 120). İdeal bir tarama testinin hasta bireyleri atlamaması için yüksek duyarlılığa sahip olması gerektiği bilinmektedir. Çalışmadaki yöntemin bir tarama testi olarak kullanılabilmesi için HPV 18 tespiti amacıyla geliştirilen LAMP reaksiyonlarının optimizasyonun artırılması ve bu tanısal gücünün iyileştirilmesi gerektiği görülmektedir.

Araştırma için toplanılan veriler ve deneyler ile elde edilen sonuçlar arasında hastaların demografik ve klinik verileri yer almamaktadır. Bu çalışmada özellikle laboratuvara gelen örnekler üzerinden yöntemin tanısal performansına odaklanılmıştır. Farklı klinik lezyonlar, maligniteler, hastalık durumu, yaş veya cinsiyet gibi hastaları

klirik ve demografik olarak ayrıştırarak özelliklere göre yöntemin tanısal performansının anlamlı bir şekilde değişip değişmeyeceği bilinmemektedir. Ancak LAMP yönteminin yüksek riskli HPV tespiti için klinik uygunluğu, özellikle hızlı sonuç süresi ve düşük maliyet sağlaması ile karmaşık donanım gereksinimi olmamasıyla önemli bir potansiyele sahiptir.

Sonuçlardan yola çıkarak, DNA izolasyon basamağı olmaksızın direkt klinik örnekten sonuç elde etmenin mümkün olması, 30 dakika gibi bir sürede sonuç alınabilmesi, reaksiyon sonu ürünlerin tespitinde görsel olarak yorumlamayı mümkün kılan farklı yöntemlerle uyumlu çalışması ve yüksek tanısal etkinliği sayesinde LAMP yönteminin HR HPV teşhisi aşamasında hasta bakım hizmetini iyileştirici sonuçları olacağı düşünülmektedir. Nükleik asit düzeyinde sağladığı yüksek özgüllük ve duyarlılık ile hasta başı tarama testi gibi kullanılması ve pozitif sonuçların donanımlı bir laboratuvarla doğrulanmasının uygun bir algoritma olabileceği düşünülmektedir. Bu tarz bir uygulama, yeterli aşılama ve tarama programlarına sahip olmayan orta ve dar gelirli ülkelerin özellikle büyük hastanelere erişimin kısıtlı olduğu bölgelerinde, toplumdaki HR HPV kaynaklı servikal kanser insidansının azaltılmasına katkı sağlayacaktır.

Çalışmanın güçlü yönleri ve sınırlılıkları değerlendirilecek olursa; öncelikle çalışmanın güçlü yönlerinden bir tanesi HPV 16 pozitif olarak toplanan örnek sayısının, bilimsel literatürdeki benzer çalışmalara kıyasla daha fazla sayıda olmasıdır (121, 122). Bu sayede yöntemin HPV 16 için tanısal performansına dair istatistiki verilerin daha güçlü bir şekilde elde edilmesi mümkün olmuştur. Çalışmanın güçlü yönlerinden bir diğeri, literatürde HPV 16 ve HPV 18 için kullanılabildiği gösterilen, dizi bilgileri bilinen hazır primerler yerine, bu araştırmaya özgü LAMP primerleri tasarlanmış olmasıdır. Bu sayede çalışmanın önceki yayınlardan ayrılarak özgün değerinin artması sağlanmıştır. Ayrıca yöntemin geliştirilmesi ve çeşitlendirilmesi amacıyla ileride yapılacak çalışmalar için bu konuya ilişkin akademik bilgiye de katkı sağlanmıştır.

HPV 16 ve 18 tespiti için tasarlanan LAMP yönteminin minimum tespit sınırının belirlenmesi çalışmanın güçlü yönlerinden bir tanesidir. Bu sayede yöntemin

hedef bölgeyi çoğaltmadaki hassasiyetine ilişkin kantitatif bir veri elde edilmiştir. Çalışmanın diğer bir güçlü yönü, reaksiyonların gerçekleşebilmesi için DNA izolasyonu adımının atlanabileceğinin gösterilmesidir. Direkt klinik örnekten DNA izolasyonu yapılmaksızın çalışılan örneklerde de hedef bölgenin çoğaltılıp tespitin mümkün olduğu gösterilmiştir. Moleküler bir tanı testinin donanımlı laboratuvar ortamına bağımlı kalmadan yapılabilmesi açısından bu nokta kritik önem taşımaktadır.

Çalışmanın güçlü yönlerinden bir diğeri, amplifikasyon ürünlerinin birkaç farklı yöntem ile tespit edilebilmiş olmasıdır. İstatistiki analizler için örneklerin tamamında veri sağlaması amacıyla tespitte gerçek zamanlı PZR cihazı kullanılmıştır. Buna ek olarak, amplifikasyon ürünlerinin tespitinde Sybr Green boyası ile renk değişimine dayalı ve yanıl akış şeridinde yakalanarak görsel yorumlamanın mümkün olduğu gösterilmiştir. Görsel olarak yorumlamanın mümkün olması daha önce de açıklandığı üzere LAMP yöntemi için önemlidir. Bu araştırmada kullanılan primerlerin, diğer reaksiyon içeriklerinin ve reaksiyon koşullarının farklı görsel tespit metotlarıyla uyum içinde çalışabileceğinin görülmesi gelecekteki araştırmaların önünü açabilmesi açısından da önem taşımaktadır.

Çalışmanın sınırlılıklarına bakacak olursak, HPV 18 için toplanan örnek sayısının az olması çalışmanın sınırlılıklarından biridir. Deneyler sonucu HPV 18 için elde edilen verinin azlığı muhtemelen, testin analitik performansını bazı parametreler için etkili bir şekilde değerlendirmeye engel olmuştur. HPV 18 örnek sayısının azlığı ve HPV 18'in toplumdaki prevalansının HPV 16'ya kıyasla daha düşük olması iki yöntem için ayrı hesaplanan pozitif prediktif değerler arasında gerçeği yansıtmayacak derecede dramatik bir farka yol açmıştır. (HPV 16 ve HPV 18 için PPD sırasıyla; %100 ve 1,71%). Bu sonuçlar yöntemin kendisinden değil, istatistiki bir kısıtlılıktan kaynaklanmaktadır.

PZR sonuçları ile LAMP reaksiyonlarına ait sonuçlarda farklılık yaşanması durumunda ilgili sonuca ait izolatların dizileme gibi referans bir yöntemle araştırılarak sonucun kesin olarak aydınlatılamamış olması çalışmanın sınırlılıkları arasında yer almaktadır. PZR ile sonucu negatif ancak LAMP reaksiyonları sonucu pozitif olarak tespit edilen veya tam tersi durumdaki bir örnek için, hangi sonucun gerçek anlamıyla

doğru olduğu kesin olarak bilinmemektedir. PZR sonuçlarının referans kabul edilmesi böylesi durumlarda testin tanısallık performansına ilişkin sonuçları etkilemiş olabilir.

Çalışmanın genel bir sınırlılığı, sonuçların görsel olarak yorumlanmasını mümkün kılan yöntemlerin ve izolasyon adımı olmaksızın direkt klinik örnekten sonuç almanın araştırıldığı örnek sayısının azlığıdır. Araştırma öncesi temin edilebilen reaktif miktarının kısıtlı olması istatistikî analizler için gerekli deneylere öncelik verilmesine sebep olmuştur. Çalışılabilen sınırlı sayıda örnek ile bahsi geçen konulara ilişkin sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar araştırmada kullanılan primerlerin ve reaksiyon protokolünün bu yöntemlerle ne derece uyum içinde çalıştığına dair genel bir fikir verse de istatistikî olarak anlamlı biçimde gösterilmesi açısından yetersiz kalmıştır. Geliştirilen protokolün direkt klinik örnek veya farklı tespit yöntemleri için araştırılması ve daha geniş bir örnek grubunda yeterliliğinin değerlendirilmesi gelecek araştırmaların konusu olabilir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, LAMP yönteminin HR HPV tiplerinden HPV 16 ve HPV 18'in tespiti için yeterli tanısallık etkinliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak yöntemin rutin tarama testi olarak uygulanabilirliği ve çoğaltılan ürünlerin pratik bir şekilde gösterilmesi konularında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Yöntemin daha karmaşık ve birbirinden farklı örnek türlerindeki performansı daha iyi aydınlatılmalıdır. Diğer HR HPV tespit yöntemleriyle karşılaştırıldığında üstünlükleri ve dezavantajları daha detaylı bir şekilde incelenmelidir. Daha geniş perspektifle ele alınacak şekilde, farklı yöntemler ile karşılaştırıldığında sağlık hizmeti sunma maliyetlerine olan etkileri incelenmelidir.

Gelecekteki araştırmalar LAMP yönteminin HR HPV tespitindeki potansiyelini daha da geliştirmeye odaklanmalıdır. Bu kapsamda LAMP yöntemi ile daha çok sayıda HPV genotipini tespit etmeye yönelik araştırmalar yapılabilir. Bunun yanı sıra aynı reaksiyon havuzu içerisinde birden fazla HPV genotipinin tespit edilmesini sağlayacak multipleks LAMP sistemlerinin geliştirilmesine odaklanılabilir. Ayrıca, yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünü arttırmak için yeni amplifikasyon stratejileri ve primerler geliştirilebilir. Bu çalışmalar, LAMP yönteminin HR HPV tespiti için alanında daha güvenilir ve verimli bir seçenek haline gelmesine katkı

sağlayabilir. Gelecekteki çalışmalar, LAMP yönteminin HPV tespitinde daha da iyileştirilmesi için yeni teknolojilerin entegrasyonunu içerebilir. Örneğin, akıllı telefonlar gibi taşınabilir cihazlarla entegre edilmiş LAMP tabanlı tespit cihazları geliştirilebilir. Bu cihazlar vasıtasıyla, görsel olarak sonuç veren ancak yorumlaması kişiden kişiye değişebilecek yanal akış şeridi veya Sybr Green kullanımı gibi yöntemlere ait sonuçların akıllı uygulamalar ile işlenerek daha güvenilir sonuçlar alınması mümkün kılınabilir.

Bunlarla birlikte, yeni geliştirilen her yöntem için geçerli olacağı gibi, LAMP yönteminin HR HPV tespitinde klinik kullanımı için standartlaştırılmış protokollerin oluşturulması büyük önem taşımaktadır. Bu tür standart protokoller sayesinde farklı laboratuvarlarda veya klinik ortamlarda yöntemin tekrarlanabilirliğinin ve güvenilirliğinin artacağı düşünülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda yüksek riskli HPV tiplerinden olan HPV 16 ve HPV 18 genotiplerinin saptanmasında LAMP yönteminin etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışmamız, ileriye dönük olarak 288 hastaya ait 288 adet servikal sürüntü örneğinden 259 adet HPV 16 ve 29 adet HPV 18 virüsünün elde edilmesiyle 1 yıl içerisinde gerçekleştirilmiştir. Laboratuvara rutin tanı amacıyla gönderilen servikal sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak izole edilen HPV DNA'lara gerçek zamanlı PZR ve LAMP reaksiyonları uygulanmıştır. Bu örnekler için PZR sonucu referans kabul edilerek LAMP yönteminin HPV 16 ve 18 saptanmasında etkinliği değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilerin istatistiki analizleri sonucunda, HPV 16 saptanması amacıyla tasarlanan LAMP yönteminin duyarlılığı %97 ve özgüllüğü %100 iken, HPV 18 için tasarlanan LAMP yönteminin duyarlılığı %86 ve özgüllüğü %97 olarak saptanmıştır. Yapılan deneylerde, DNA izolasyon basamağına gerek duyulmaksızın direkt klinik örnekten sonuca ulaşmanın da mümkün olduğu gösterilmiştir. Ayrıca LAMP reaksiyonlarına ait son ürünlerin tespitinde kolorimetrik boya veya yanıl akış şeridi gibi görsel sonuç veren farklı yöntemlerin kullanımının mümkün olabileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda HPV 18 saptanması amacıyla geliştirilen LAMP yönteminin tanılal performansı HPV 16 için geliştirilen LAMP yöntemine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Bu duruma yol açabilecek nedenler ve çözümleri tartışma bölümünde ele alınmıştır. Bu çalışma sonunda aşağıda maddeler halinde belirtilen önerilerin vurgulanmasının uygun olduğu düşünülmüştür:

i. LAMP yöntemi PZR'ye kıyasla uygulaması basit, karmaşık laboratuvar ekipmanları gerektirmeyen, hızlı sonuç veren ve daha az maliyetli bir yöntemdir. Araştırma sonucu ortaya çıkan tanılal etkinliği de dikkate alındığında, büyük hastanelere erişimin kısıtlı olduğu bölgelerde servikal kanserle mücadele kapsamında HR HPV taranması için LAMP yönteminin kullanımı etkili olabilir. Hastanın görüldüğü poliklinik şartlarında uygulanıp 30 dakika içinde sonuç alınabilen bu

yöntem sayesinde servikal örneklerinde HR HPV tipleri saptanan hastalar kesin sonuç için daha donanımlı bir merkeze yönlendirilebilir. Böyle bir uygulamanın yüksek özgüllük ve duyarlılık ile taranabilen birey sayısını arttırması sayesinde toplumda görülen servikal kanser insidansını azaltarak halk sağlığını iyileştirici etkileri olacağı düşünülmektedir.

ii. Gelecekteki araştırmalar, LAMP yönteminin HR HPV tespitinde klinik kullanım için daha uygun hale getirilmesine odaklanmalıdır. Bu amaçla, primer tasarımları daha fazla optimize edilmeli ve daha başarılı tanısal performans elde edilmelidir. Aynı reaksiyon havuzunda birden fazla HR HPV tespitini mümkün kılmak amacıyla LAMP yönteminin multipleks hale getirilmesi için çalışmalar yapılmalıdır. LAMP yönteminin avantajlı yönlerini güçlendirip klinik uygulamaya uygun hale getirmek amacıyla, direkt klinik örnek kullanımı ve görsel sonuç almanın test edildiği çalışmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca, LAMP yönteminin farklı klinik ortamlarda ve popülasyonlarda performansını değerlendiren çalışmalar, daha geniş kullanımını ve etkisini değerlendirmek için değerli olacaktır.

Sonuç olarak çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, LAMP yönteminin klinik örneklerden HPV 16 ve HPV 18 saptanmasında yeterli tanısal etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmadaki sonuçlar LAMP yönteminde direkt klinik örnek kullanımı ve tespit aşamasındaki çeşitliliğe dair bilinenleri desteklemektedir. Bu veriler, daha büyük ve çeşitli örnek gruplarının bağımsız olarak incelendiği, diğer kısıtlılıkları giderilmiş başkaca çalışmalarda detaylandırılmalı ve standart protokoller geliştirilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015;476:341-4.
2. Howley PM. Papillomaviruses. In: Howley PM, editor. *Fields Virology. DNA Viruses*. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2022. p. 82-121.
3. Petca A, Borislavski A, Zvanca ME, Petca RC, Sandru F, Dumitrascu MC. Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review). *Exp Ther Med*. 2020;20(6):186.
4. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009;10(4):321-2.
5. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(14):1072-9.
6. Scott-Wittenborn N, Fakhry C. Epidemiology of HPV Related Malignancies. *Semin Radiat Oncol*. 2021;31(4):286-96.
7. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Pineros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021.
8. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet*. 2019;393(10167):169-82.
9. Dursun P, Ayhan A, Mutlu L, Caglar M, Haberal A, Gungor T, et al. HPV types in Turkey: multicenter hospital based evaluation of 6388 patients in Turkish gynecologic oncology group centers. *Turk Patoloji Derg*. 2013;29(3):210-6.
10. Bal MS, Goyal R, Suri AK, Mohi MK. Detection of abnormal cervical cytology in Papanicolaou smears. *J Cytol*. 2012;29(1):45-7.
11. Chrysostomou AC, Stylianiou DC, Constantinidou A, Kostrikis LG. Cervical cancer screening programs in Europe: the transition towards HPV vaccination and population-based HPV testing. *Viruses*. 2018;10(12):729.
12. Patel MM, Pandya AN, Modi J. Cervical Pap smear study and its utility in cancer screening, to specify the strategy for cervical cancer control. *National journal of community medicine*. 2011;2(01):49-51.

13. Health WHOR, Organization WH, Diseases WHOC, Promotion H. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice: World Health Organization; 2006.
14. Açıkgöz A, Ergör G. Cervical cancer risk levels in Turkey and compliance to the national cervical cancer screening standard. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(4):923-7.
15. Sevil S, Kevser O, Aleattin U, Ozlem D. The frequency of having pap-smear tests among women between 15-64 years old and the evaluation of the level of their knowledge. *JPMMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2013;63(7):873-7.
16. Gultekin M, Zayifoglu Karaca M, Kucukyildiz I, Dundar S, Boztas G, Semra Turan H, et al. Initial results of population based cervical cancer screening program using HPV testing in one million Turkish women. *International journal of cancer*. 2018;142(9):1952-8.
17. Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*. 2021;10(8):1931.
18. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*. 2000;28(12):e63-e.
19. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao P, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology*. 2008;18(6):407-21.
20. Peter M. Howley DMK. Papillomaviridae. In: Peter M. Howley DMK, editor. *Fields Virology. DNA Viruses*. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2022. p. 51-81.
21. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-5.
22. Gissmann L, Hausen HZ. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976;73(4):1310-3.
23. Gissmann L, Pfister H, Zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology*. 1977;76(2):569-80.

24. Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Current topics in microbiology and immunology*. 1977;1-30.
25. Hausen HZ, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *International journal of cancer*. 1974;13(5):650-6.
26. Torre GD, Pilotti S, De Palo G, Rilke F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori Journal*. 1978;64(5):549-53.
27. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The EMBO journal*. 1984;3(5):1151-7.
28. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990;248(4951):76-9.
29. Dyson N, Guida P, Münger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *Journal of virology*. 1992;66(12):6893-902.
30. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1167-73.
31. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 2013;445(1-2):232-43.
32. Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda GA, Zhou Y, et al. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Front Public Health*. 2020;8:552028.
33. Van Doorslaer K, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, et al. The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic acids research*. 2017;45(D1):D499-D506.
34. Zekan J, Sirotkovic-Skerlev M, Skerlev M. Oncogenic aspects of HPV infections of the female genital tract. *DNA Replication-Current Advances: IntechOpen*; 2011.

35. Zheng Z-M, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2006;11:2286.
36. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews cancer*. 2002;2(5):342-50.
37. Tüney İ, Altay A, Ergünay K, Önder SÇ, Usubütün A, Salman MC, et al. HPV types and E6/E7 mRNA expression in cervical samples from Turkish women with abnormal cytology in Ankara, Turkey. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2017;47(1):194-200.
38. Graham SV. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future microbiology*. 2010;5(10):1493-506.
39. Howley PM LD. Papillomaviruses. In: Knipe DM HP, editor. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2007. p. 2299-354.
40. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(8):550-60.
41. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in medical virology*. 2006;16(2):83-97.
42. Oriel J. Natural history of genital warts. *British Journal of Venereal Diseases*. 1971;47(1):1.
43. HIPPELÄINEN MI, Yliskoski M, SYRJÄNEN S, Saastamoinen J, HIPPELÄINEN M, Saarikoski S, et al. Low concordance of genital human papillomavirus (HPV) lesions and viral types in HPV-infected women and their male sexual partners. *Sexually transmitted diseases*. 1994:76-82.
44. Koutsky L, Kiviat NB. Genital human papillomavirus. *Sexually transmitted diseases* New York, NY: McGraw-Hill. 1999:347-59.
45. Meyers J, Ryndock E, Conway MJ, Meyers C, Robison R. Susceptibility of high-risk human papillomavirus type 16 to clinical disinfectants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(6):1546-50.

46. Casalegno J-s, Le Bail Carval K, Eibach D, Valdeyron M-L, Lamblin G, Jacquemoud H, et al. High risk HPV contamination of endocavity vaginal ultrasound probes: an underestimated route of nosocomial infection? PloS one. 2012;7(10):e48137.
47. Smith EM, Ritchie JM, Yankowitz J, Swarnavel S, Wang D, Haugen TH, et al. Human papillomavirus prevalence and types in newborns and parents: concordance and modes of transmission. Sexually transmitted diseases. 2004;57-62.
48. Ryndock EJ, Meyers C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? : Taylor & Francis; 2014. p. 1165-70.
49. Sun Kuie T, Tew Hongw H, Soo Kim LT. Is genital human papillomavirus infection always sexually transmitted? Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology. 1990;30(3):240-2.
50. Mammas IN, Dalianis T, Doukas SG, Zaravinos A, Achtsidis V, Thiagarajan P, et al. Paediatric virology and human papillomaviruses: An update. Experimental and Therapeutic Medicine. 2019;17(6):4337-43.
51. Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. Journal of Infectious Diseases. 2010;202(12):1789-99.
52. Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2018;47:14-26.
53. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. The lancet oncology. 2010;11(11):1048-56.
54. Yuce K, Pinar A, Salman MC, Alp A, Sayal B, Dogan S, et al. Detection and genotyping of cervical HPV with simultaneous cervical cytology in Turkish women: a hospital-based study. Archives of gynecology and obstetrics. 2012;286:203-8.

55. Altay Kocak A, Kazanci F, Dogu Tok C, Onan A, Erdem O, Ozkan S, et al. The prevalence and distribution of human papillomavirus in 4267 Turkish women with or without cervical lesions: a hospital-based study. *Journal of Medical Virology*. 2022;94(10):5026-32.
56. Joyce JG, Tung J-S, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(9):5810-22.
57. Surviladze Z, Dziduszko A, Ozbun MA. Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS pathogens*. 2012;8(2):e1002519.
58. McBride AA, Oliveira JG, McPhillips MG. Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell Cycle*. 2006;5(14):1499-502.
59. Conger KL, Liu J-S, Kuo S-R, Chow LT, Wang TS-F. Human papillomavirus DNA replication: Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase α /primase. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(5):2696-705.
60. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):362-72.
61. Cheng S, Schmidt-Grimminger D-C, Murant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes & development*. 1995;9(19):2335-49.
62. Bedell MA, Hudson JB, Golub TR, Turyk ME, Hosken M, Wilbanks GD, et al. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *Journal of virology*. 1991;65(5):2254-60.
63. Krawczyk E, Supryniewicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J, et al. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *The American journal of pathology*. 2008;173(3):682-8.
64. Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic oncology*. 2008;109(2):S15-S21.

65. Yanofsky VR, Patel RV, Goldenberg G. Genital warts: a comprehensive review. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. 2012;5(6):25.
66. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006;24:S16-S22.
67. Culp TD, Spatz CM, Reed CA, Christensen ND. Binding and neutralization efficiencies of monoclonal antibodies, Fab fragments, and scFv specific for L1 epitopes on the capsid of infectious HPV particles. *Virology*. 2007;361(2):435-46.
68. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *The lancet oncology*. 2005;6(5):271-8.
69. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus research*. 2002;89(2):191-9.
70. Ljubojevic S, Skerlev M. HPV-associated diseases. *Clin Dermatol*. 2014;32(2):227-34.
71. Ljubojević S, Lipozenčić J, Ljubojević Grgec D, Prstačić R, Skerlev M, Bukvić Mokos Z. Human papilloma virus associated with genital infection. *Collegium antropologicum*. 2008;32(3):989-97.
72. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999;189(1):12-9.
73. Ambrosio M, Onorati M, Rocca B, Santopietro R. Vulvar cancer and HPV infection: analysis of 22 cases. *Pathologica*. 2008;100(5):405-7.
74. Palefsky JM, Rubin M. The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2009;36(1):187-200.
75. Schwartz RA, Janniger CK. Bowenoid papulosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1991;24(2):261-4.

76. Handisurya A, Rieger A, Bago-Horvath Z, Schellenbacher C, Bankier A, Salat A, et al. Rapid progression of an anal Buschke–Löwenstein tumour into a metastasising squamous cell carcinoma in an HIV-infected patient. Sexually transmitted infections. 2009;85(4):261-3.
77. Grayson W, Calonje E, McKee PH. Infectious diseases of the skin-Leprosy. Pathology of the skin with clinical correlations 2005. p. 910-8.
78. Rogers HD, MacGregor JL, Nord KM, Tyring S, Rady P, Engler DE, et al. Acquired epidermodysplasia verruciformis. Journal of the American Academy of Dermatology. 2009;60(2):315-20.
79. Sterling JC. Human papillomaviruses and skin cancer. Journal of clinical virology. 2005;32:67-71.
80. Burd EM, Dean CL. Human Papillomavirus. Microbiology Spectrum. 2016;4(4):10.1128/microbiolspec.dmi2-0001-2015.
81. Rozemeijer K, Penning C, Siebers AG, Naber SK, Matthijsse SM, van Ballegooijen M, et al. Comparing SurePath, ThinPrep, and conventional cytology as primary test method: SurePath is associated with increased CIN II+ detection rates. Cancer Causes & Control. 2016;27:15-25.
82. Taylor S, Kuhn L, Dupree W, Denny L, De Souza M, Wright Jr TC. Direct comparison of liquid-based and conventional cytology in a South African screening trial. International journal of cancer. 2006;118(4):957-62.
83. Martin CM, O’Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology. 2011;25(5):605-15.
84. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn L-J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. Journal of clinical virology. 2005;32:43-51.
85. Sato S, Maruta J-i, Konno R, Yajima A. In situ detection of HPV in a cervical smear with in situ hybridization. Acta cytologica. 1998;42(6):1483-5.
86. Melchers W, Van den Brule A, Walboomers J, De Bruin M, Burger M, Herbrink P, et al. Increased detection rate of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction as compared to modified FISH and southern blot analysis. Journal of Medical Virology. 1989;27(4):329-35.

87. Harper DM, Longacre MR, Noll WW, Belloni DR, Cole BF. Factors affecting the detection rate of human papillomavirus. *The Annals of Family Medicine*. 2003;1(4):221-7.
88. Waters DL, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Cereal Genomics: Methods and Protocols*. 2014:65-75.
89. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(9):2095.
90. Jacobs MV, Snijders P, Van Den Brule A, Helmerhorst T, Meijer C, Walboomers J. A general primer GP5+/GP6 (+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(3):791-5.
91. Gravitt P, Peyton C, Alessi T, Wheeler C, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(1):357-61.
92. Kleter B, van Doorn L-J, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *The American journal of pathology*. 1998;153(6):1731-9.
93. Tucker RA, Unger ER, Holloway BP, Swan DC. Real-time PCR-based fluorescent assay for quantitation of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. *Molecular Diagnosis*. 2001;6:39-47.
94. Poljak M, Valenčak AO, Domjanič GG, Xu L, Arbyn M. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses: a global overview. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020;26(9):1144-50.
95. Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chemical reviews*. 2015;115(22):12491-545.
96. Ushio M, Yui I, Yoshida N, Fujino M, Yonekawa T, Ota Y, et al. Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroups A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of medical virology*. 2005;77(1):121-7.

97. Xu J, Zheng Q, Yu L, Liu R, Zhao X, Wang G, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of genetically modified maize T25. *Food science & nutrition*. 2013;1(6):432-8.
98. Montrasio C. Development of a Software Application for Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Primer Design. 2016.
99. Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microbial pathogenesis*. 2017;107:54-61.
100. Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol*. 2018;124(3):626-43.
101. Zhou D, Guo J, Xu L, Gao S, Lin Q, Wu Q, et al. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Sci Rep*. 2014;4:4912.
102. Sahoo PR, Sethy K, Mohapatra S, Panda D. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet World*. 2016;9(5):465-9.
103. Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glokler JF. Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*. 2015;58(4):189-94.
104. Srisrattakarn A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Wonglakorn L, Saenjamla P, et al. Rapid and simple identification of carbapenemase genes, bla (NDM), bla (OXA-48), bla (VIM), bla (IMP-14) and bla (KPC) groups, in Gram-negative bacilli by in-house loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017;33(7):130.
105. Thongkao K, Longyant S, Silprasit K, Sithigorngul P, Chaivisuthangkura P. Rapid and sensitive detection of *Vibrio harveyi* by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick targeted to vhhP2 gene. *Aquaculture Research*. 2015;46(5):1122-31.

106. Fowler VL, Howson EL, Madi M, Mioulet V, Caiusi C, Pauszek SJ, et al. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of vesicular stomatitis New Jersey virus: Use of rapid molecular assays to differentiate between vesicular disease viruses. *Journal of virological methods*. 2016;234:123-31.
107. Mabey D, Peeling RW, Ustianowski A, Perkins MD. Diagnostics for the developing world. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(3):231-40.
108. Tanner NA, Zhang Y, Evans Jr TC. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques*. 2015;58(2):59-68.
109. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;289(1):150-4.
110. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 2007;70(3):499-501.
111. Watts MR, James G, Sultana Y, Ginn AN, Outhred AC, Kong F, et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014;90(2):306.
112. Bi A, Nakajima C, Fukushima Y, Tamaru A, Sugawara I, Kimura A, et al. A rapid loop-mediated isothermal amplification assay targeting hspX for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Japanese journal of infectious diseases*. 2012;65(3):247-51.
113. Wastling SL, Picozzi K, Kakembo AS, Welburn SC. LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4(11):e865.
114. MedCalc Software Ltd. Diagnostic test evaluation calculator. https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php (Version 22.023; accessed April 10).
115. Hajian-Tilaki K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *Journal of biomedical informatics*. 2014 48:193-204.

116. Zhang L, Ju Y, Hu H, Ma C, Huang Y, Gong L, et al. Preliminary establishment and validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for convenient screening of 13 types of high-risk human papillomaviruses in cervical secretions. *Journal of Virological Methods*. 2022;303:114501.
117. Karaağaoğlu A, Karakaya, Karabulut J. & Kılıçkap, M. . Tanı testlerinin değerlendirilmesinde istatistiksel yöntemler.2016.
118. Landaverde L, Wong W, Hernandez G, Fan A, Klapperich C. Method for the elucidation of LAMP products captured on lateral flow strips in a point of care test for HPV 16. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020;412:6199-209.
119. Xi X, Cao W-L, Yao X, Chen J, Huang D, Yang T, et al. Rapid diagnosis of seven high-risk human papillomavirus subtypes by a novel loop-mediated isothermal amplification method. *Molecular and Cellular Probes*. 2022;61:101787.
120. Luo L, Nie K, Yang M-J, Wang M, Li J, Zhang C, et al. Visual detection of high-risk human papillomavirus genotypes 16, 18, 45, 52, and 58 by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(10):3545-50.
121. Saetiew C, Limpaiboon T, Jearanaikoon P, Daduang S, Pientong C, Kerdsin A, et al. Rapid detection of the most common high-risk human papillomaviruses by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of virological methods*. 2011;178(1-2):22-30.
122. Kumvongpin R, Jearanaikool P, Wilailuckana C, Sae-Ung N, Prasongdee P, Daduang S, et al. High sensitivity, loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric gold-nanoparticle probes for visual detection of high risk human papillomavirus genotypes 16 and 18. *Journal of virological methods*. 2016;234:90-5.