

Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Human Papillomavirus'unun, Genital Biyopsi Örneklerinden PCR ile Hızlı Tanısı ve Tip Tayini İçin Yapılan Bir Ön Çalışma

THE RAPID DETECTION AND GENOTYPING OF HUMAN PAPILOMAVIRUS IN GENITAL BIOPSI SPECIMENS BY PCR IN MICROBIOLOGY LABORATORY- PRELIMINARY STUDY

Gülendam BOZDAYI*, Aydan BİRİ**, Seyyal ROTA***

* Öğr.Gör.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,

** Yrd.Doç.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,

*** Prof.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, ANKARA

Özet

Amaç: Genital biyopsi örneklerinden, patolojik incelemelere gereksinim kalmadan, Human Papillomavirus tanı ve genotip tayininin Mikrobiyoloji laboratuvarlarında nested-PCR yöntemi ile yapılarak klinisyene hızlı sonuç verilebilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın yapıldığı yer: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'nden gönderilen örnekler aynı Fakültenin Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Araştırma Laboratuvarında çalışılmıştır.

Materyal ve Metod: Hastadan alınan iki ayrı biyopsi örneği fosfat buffer salin içerisinde laboratuvara ulaştırılmış ve in-house PCR yöntemi ile virus DNA'sı tesbit edildikten sonra, kanserojen olan tip 16 ve 18'in tayin edilebilmesi için özgül primerler kullanılarak tekrar PCR yapılmıştır.

Bulgular: Hastadan alınan iki ayrı biyopsi örneğinin her ikisinde de Human Papillomavirus DNA'sı gösterilmiştir. Daha sonra yapılan tip tayininde de Human Papillomavirus tip 18 saptanmıştır.

Sonuç: Direkt biyopsi örneği kullanılarak yapılan nested-PCR yöntemi ile virüsü rahatlıkla tesbit edebileceğimiz ve yine bu yöntemle tip tayini yaparak klinisyeni tedavi açısından yönlendirebileceğimiz sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Human Papilloma Virus, PCR

T Klin Jinekoloj Obst 2002, 12:463-465

Summary

Aim: In this study we aimed the detection and genotyping of Human Papillomaviruses from genital biopsy samples by PCR in Microbiology Laboratory and give a rapid result to the clinicians.

Institute: The samples obtained from Obstetrics and Gynecology Clinic of Gazi University Medical School and were detected in Clinical Microbiology Research Laboratory of the same Faculty.

Material and Method: The two different biopsy samples obtained from a patient with papilloma were sent to the laboratory in Phosphat buffer salin and after detection of virus DNA by in house PCR, for detection of cancerogen types 16 and 18, PCR was again carried out by using specific primers.

Results: HPV DNA was demonstrated in both of the biopsy specimens Human Papillomavirus DNA was assessed by PCR and Human Papillomavirus type 18 was detected subsequently by the same method.

Discussion: It has been concluded that we can easily detect the virus by nested-PCR with direct biopsy sample and orientate the clinician for treatment by type detection with this method.

Key Words: Human Papillomaviruses, PCR

T Klin J Gynecol Obst 2002, 12:463-465

Human Papilloma virus papovaviridae ailesinden, DNA genomu olan, ikozahedral yapıda zarfsız bir virüsdür (1). Genital sistem HPV enfeksiyonunun prevalansı oldukça yüksek olup alt genital sistem malignensileri, özellikle servikal kanserle ilişkisi saptanmıştır. (2). HPV 16 ve 18 tipleri, daha az olarak da 31 ve 33 tipleri servikal intraepitelial neoplazilere (CIN), servikal ve vulva kanserlerine neden olmaktadır (3). Fakat son yıllarda özellikle genç kadınlarda HPV, vulva kanseri etiyojisinde giderek artan bir önem kazanmıştır ve vulva kanserlerinin %50 'sinde virüsün etken olduğu ve özellikle de tip 16'nın rol aldığı ileri sürülmüştür (4). Virüsün in vitro

üretilememiş olması ve güvenilir bir serolojik test olmadığından tanı amacı ile moleküler yöntemlerle çalışmalara ağırlık verilmiştir. Özellikle genotip tayini de yapılabilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) son zamanlarda en yoğun şekilde kullanılan yöntemlerden biri olmuştur (5,6).

Bu çalışmada vulvasında iki adet papilloma lezyonu olan hastadan alınan biyopsi örneklerinden patolojik incelemelere gerek kalmadan direkt polimeraz zincir reaksiyonu ile viral DNA saptanması ve genotip tayini yapılması amaçlanmıştır.

Materyal Ve Metod

Örnekler: Hastanemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde, hastanın vulvasındaki iki adet papillomdan iki ayrı biyopsi örneği alınmış ve fosfat buffer salin (PBS) içerisinde laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Her iki örnek de aynı gün çalışmaya alınmıştır.

DNA saflaştırılması: Örnekler PBS içerisinden alındıktan sonra 0.1mg/ml proteinaz K içeren lizis solüsyonu (20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, %0.1 SDS) içinde 1 saat 60°C'de, takiben 1 gün 37°C'de bekletilmiştir. Fenol-kloroform-izoamilalkol ile DNA saflaştırılması yapılmıştır. Ardından 3M sodyum asetat içeren saf etanol eklenip -20°C'de bir gece bekletilerek çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün örnekler bu kez %70'lik etilalkol ile muamele edilmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra 50µl steril deiyonize su ilave edilerek kuru blok'da 55°C'de 10 dakika süspansedilmiştir (7). Süspansedilen örnekler hemen çoğaltma işlemine alınmışlardır.

DNA'nın çoğaltılması: Bu çalışmada kullanılan primerler çok sayıda HPV genotipi için ortak olan genel primerlerdir. HPV genomunun L1 (major viral kapsid proteini yapımıyla görevli) bölgesinden seçilmiştir. Primerler Tib Mol-biol (Berlin, Almanya)'de sentez ettirilmiştir. HPV primer seti olarak MY09 ve MY11 seti (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'), (5'-CMCAGGGWCATAAYAATGG-3') 452 bp uzunluğunda segmentleri çoğaltmaktadır (M*; R**; W***) (7). Pozitif kontrol olarak Caski hücre DNA'sı kullanılmıştır (3). Her çoğaltma işlemi sırasında mutlaka bir DNA içermeyen negatif kontrol ilave edilmiştir. Çoğaltma işlemi için 4 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10mM Tris HCl (pH 9) içinde her dNTP'den 100 µM (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), her primerden 100 pmol ve 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi (DNA mp ltd., Hants, UK) içeren 45 µl olarak hazırlanan karışım içerisine saflaştırılmış 5 µl DNA eklenerek gerçekleştirilmiştir. Cihaz olarak MJ Research thermalcycler (USA) kullanılmıştır. Thermalcycler; denatürasyon için 94°C'de 5 dakika, takiben 94°C'de 20 saniye, 55°C'de 45 saniye, 72 °C'de 7 dakika 35 döngü ve en son olarakta 72°C'de 7 dakika olacak şekilde programlanmıştır. Çoğaltılan ürünlerden 7.5µl, 2.5µl jel yükleme solüsyonu ile birlikte, etidyum bromid içeren %1.5'luk agaroz jelde yürütüldükten sonra UV transiluminatör altında HPV için 450 bp büyüklüğüne denk gelen band aranmıştır (7).

HPV tip tayini: Elde edilen PCR ürünlerinden 5µl, HPV 16 primer seti için MY09 ve MY14 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3' ve 5'CATACACCTCCAGCACCTAA-3') ve HPV 18 primer seti için MY11 ve WD74 (5'-CMCAGGGWCATAAYAATGG-3' ve 5'GGATGCTGCACCGGCTGA) kullanılmıştır (M*; R**; W***) (8,9). Çoğalttığımız genel HPV ürününden 5µl alınıp, HPV 16 ve 18 primer seti içeren 95µl'lik reaksiyon karışımına aktarı-

larak çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Primer setleri haricindeki diğer karışımlar ve thermal cyler programı yukarıda kullandığımız şekildedir. Çoğaltılan ürünler etidyum bromid içeren %1.5'luk agaroz jelde yürütüldükten sonra UV transiluminatör altında HPV16 için 110 bp, HPV18 için 140bp büyüklüğüne denk gelen bantlar aranmıştır (7).

Bulgular

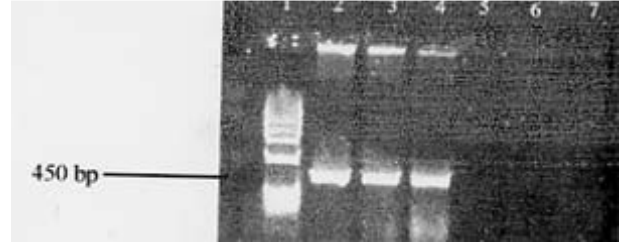
Hastadan alınan iki ayrı biyopsi örneğinin her ikisinde de HPV DNA'sı gösterilmiştir. Daha sonra yapılan tip tayinin de ise HPV 18 saptanmıştır.

Şekil 1'de, 450 baz pair (bp) ağırlığında genel primer dizisiyle elde edilen HPV bandı gösterilmiştir.

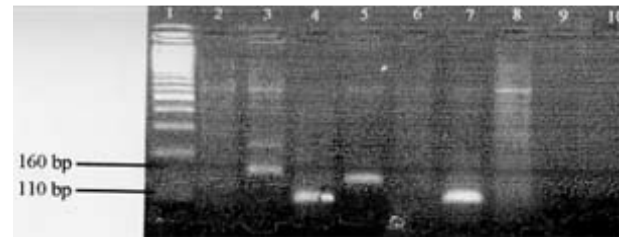
Şekil 2'de ise tipe özgül primerler kullanılarak gösterilen 110 bp ağırlığında HPV 16 ve 160 bp ağırlığında HPV 18 bantları gösterilmiştir. Şekil 2'deki 3. Kolon hastadan elde ettiğimiz tip 18 HPV DNA bandıdır.

Tartışma

Bu çalışmada, direkt biyopsi örneğinden Human Papilloma Virus DNA'sını göstermek amacıyla bir DNA elde protokolü geliştirilmiş ve tip tayini yapabilmek amacıyla ikinci tur çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Nested



Şekil 1. 1. Kolon φx174 Hae III Digested DNA markeri, 2,3,4. Kolonlar 450 bp büyüklüğünde HPV DNA bandı.



Şekil 2. 1. Kolon φx174 Hae III Digested DNA markeri, 2. Kolon negatif kontrol, 3. Kolon 160 bp ağırlığında HPV 18 bandı, 4. Kolon 110 bp ağırlığında HPV 16 bandı, 5. Kolon HPV 18 pozitif kontrol, 6.kolon negatif kontrol, 7. Kolon HPV 16 pozitif kontrolü, 8. Kolon negatif kontrol, 9 ve 10. Kolon boş.

yani iki aşamalı PCR yöntemi denen bu yöntem ile önce virusa özgül DNA'yı ardında genotipine spesifik bölgeyi çoğaltarak tip tayini yapılabilir. Bir virüsün varlığını tesbit etmenin en güvenilir yöntemi nükleik asit'in varlığının gösterilmesidir. Bizim kullandığımız proteinaz K içeren lizis solüsyonu dokunun tamamen parçalanmasını ve epitel artıklarının erimesine neden olmaktadır. PCR yönteminde en ciddi inhibisyon etkeni olan epiteller bu yöntem ile etkisiz hale getirilmiştir. Kullanmış olduğumuz yöntem Tuncer ve ark.'nın parafin bloğa gömülü servikal biyopsi örneklerine uygulamış oldukları DNA saflaştırılması yönteminden köken alınarak geliştirilmiştir (3). PCR yöntemi, az miktarda virus ve teorik olarak klinik örnekte tek kopya genin varlığında bile hızlı ve özgül olarak tanı imkanı sağlamaktadır (10-12). Ülkemizde HPV tanısı Patoloji kliniklerince ve son zamanlarda ise Mikrobiyoloji laboratuvarlarında Hybride capture yöntemi ile konulmaktadır. Ancak tanı amacıyla alınan ve patoloji laboratuvarlarına gönderilen örneklerin tanı süresinin uzun olması ve tip tayini yapılamıyor olması PCR yönteminin önemini ortaya koymaktadır. Hybride capture yönteminde ise testin çok pahalı olması ve yine tek tek tip tayini yapamayıp ancak yüksek riskli ve düşük riskli grup şeklinde sonuç veriyor olması bu testin olumsuz yönü olarak değerlendirilmektedir (13). Genel HPV primeri kullanmakta olan araştırmacılar tarafından normal servikal sitolojisi olan kadınlarda HPV DNA saptanmakta ve bu durum çelişkili yorumlara neden olmaktadır (3). Normal serviksde HPV DNA varlığı, kirli çalışma (kontaminasyon), serviksde mevcut yüzeysel kontaminasyon veya HPV latensine bağlı olabilir (14). Bu konunun açıklığa kavuşabilmesi için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Kullanmış olduğumuz DNA elde yöntemi ile çok daha kısa sürede ve direkt olarak gönderilen biyopsi örneğinden virüs DNA'sını gösterebiliyoruz. Elde ettiğimiz ürünü ikinci kez tipe spesifik primer seti kullanarak tekrar çoğaltıyor ve hangi tip olduğunu tesbit edebiliyoruz. Çalışmamızın sonucunda görüldüğü gibi HPV tiplerini tek tek verebiliyor olmamız klinisyen açısından oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca in-house nested-PCR yapıyor olmamız testin maliyetini oldukça ucuza getirmektedir.

Sonuç olarak bu PCR protokolü ile mikrobiyoloji laboratuvarlarına gönderilen genital biyopsi örneklerinden nested PCR yöntemi ile hızlı bir şekilde HPV'nin tanısı, tip tayini yapılabilecek, klinisyene hasta takip ve tedavisinde büyük kolaylık sağlanacağı fikrindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Collier L, Oxford J. Papovaviridae. In: Collier L ed. Human Virology, second ed. United states by Oxford University Press Inc., New York, 2000: 113-5.
2. Tuncer S. İnsan Papilloma Virusları. In: Ustaçelebi Ş ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, birinci baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 801-2.
3. Tuncer S, Ustaçelebi. Servikal biyopsi örneklerinde İnsan Papillomavirüsleri tip 16 ve 18'in polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. Flora 1996; 1: 40-4.
4. Atasü T, Şahmay S. Vulvanın habis hastalıkları. In: Jinekoloji. 1984: 216-25.
5. Lorincz AT. Detection of human papillomavirus infection by nucleic acid hybridization. Obstet Gynecol Clin North Am 1987; 14: 451-69.
6. Syrjanen SM, Saastamoinen J, Chang F, Ji H, Syrjanen K: Colposcopy, punch biopsy, in situ DNA hybridization and the PCR in searching for genital HPV infections in women with normal PAP smears. J Med Virol 2000; 31: 259-66.
7. Maniatis T, Fritsch EF. Molecular Cloning: A laboratory Manual. In Sambrook J ed, third ed. Cold Spring Harbor, New York. 1990: 1334.
8. Baay MFD, Quint WGV, Koudstaal J et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. J Clin Microbiol 1996; 34(3): 745-7.
9. Poljak Mario, Seme Katja. Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. J Virol Methods 1996; 56: 231-8.
10. Manos MM, Thing Y, WrighDK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of PCR for the detection of genital HPV. Cancer Cells 1989; 7:209-14.
11. Syrjanen SM, Saastamoinen J, Chang F, Ji H, Syrjanen K. Colposcopy, punch biopsy, insitu DNA hybridization and the PCR in searching for genital HPV infections in women with normal PAP smears. J Med Virol 1990; 31:259-66.
12. Comar M, Spano A, Canova S, et al. Direct in situ PCR allows rapid and sensitive detection of high risk human papilloma cytologic specimens and formalin -fixed paraffin tissues by fluorescent labelling. Int J Oncol 2001; 18(1): 181-5.
13. Carr NJ, Bratthauer GL, Lichy JH, et al. Squamous cell papillomas of the esophagus: a study of 23 lesions for human papillomavirus by in situ hybridization and the PCR. Hum Pathol 1994; 25(5): 536-40.
14. Shifmann MH. Epidemiology of cervical HPV infections. Current Topics in Microbiology and Immunology 1994; 186: 55-81.

Geliş Tarihi: 11.01.2002

Yazışma Adresi: Dr.Gülendam BOZDAYI
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,
gbozdayi@hotmail.com