

İnsan Papilloma Virüsü

Human Papillomavirus

Gülçin Alp Avcı¹, Güleendam Bozdayı²

¹Hüti Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Mikrobiyoloji, Çorum

²Gazî Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is a double-stranded DNA virus with a spheric protein capsid and without an envelope. Functionally active early and late proteins are created from regions of early and late gene. Typically viral integration occur in E1 and E2 regions. It is known that the connections of HPV E6 protein to cellular protein p53 and E7 protein to Rb protein play a role in oncogenesis mechanism. Besides its sexual transmission, HPV can be transmitted by direct or indirect contact with the skin lesions. It is more often transmitted with sexual intercourse, and is also associated with malignancies other than cervical cancer. Currently, the determination of HPV infection which is a major contributing factor for cervical cancer is very important. In comparison with other malignancies, cervical cancer is preventable. Thus, screening, early diagnosis and treatment of lesions associated with HPV infection has a paramount importance.

Key words: diagnosis; human papillomavirus; prevention and control; replication; transmission; vaccine

ÖZET

İnsan Papilloma Virüsü (HPV), zarfı olmayan, sferik protein kapside sahip ve çift sarmallı DNA taşıyan bir virüsdür. Fonksiyonel olarak aktif erken ve geç proteinler, erken (E) ve geç (L) gen bölgelerinden oluşturulur. Viral integrasyon tipik olarak E1 ve E2 bölgelerinde meydana gelmektedir. E6 proteininin hücresel P53 proteinine; E7 proteininin ise Rb proteinine bağlanarak onkogenез mekanizmasında rol aldığı bilinmektedir. HPV, sadece cinsel yolla değil, aynı zamanda kontamine yüzeylerle indirekt, ciltteki lezyonlarla direkt olarak da bulaşabilmektedir. En sık cinsel yolla bulaşmakta olup, serviks kanseri dışındaki malignansilerde de gözlenmektedir. Günümüzde serviks kanseri için majör etken olarak kabul edilen HPV tanısı oldukça önemlidir. Serviks kanseri, “önlenebilir” bir kanser tipi olması sebebiyle diğer kanser türlerinden ayırt edilebilmektedir. Bu nedenle HPV ile ilişkili enfeksiyonlarda özellikle tarama, erken teşhis ve tedavi büyük öneme sahiptir.

Anahtar kelimeler: tanı; insan papilloma virüsü; korunma ve kontrol; replikasyon; bulaş; aşılama

Giriş

İnsan papilloma virüsü (HPV), papillomaviridae ailesinde bulunmaktadır. Papillomaviridae ailesinde 12 cins yer almaktadır. Bunlar alfa, beta, gamma, mu ve nu cinsleri ile bunların dışında kalan ve hayvan papilloma virüsleri oluşturan yedi cinsi içermektedir¹. Alfa papilloma cinsi, en büyük grup olup, bu grupta mukozayı enfekte eden tipler ile deride yaygın sigillere sebep olan kutanöz tipler yer almaktadır. Bu virüsler 50–55 nm çapında zarfsız, çift sarmallı, ikozahedral nükleokapsitli ve proteinle çevrili DNA genomu içermektedirler^{2,3}.

Diğer birçok virüsün aksine HPV'ler, antijenik yapılarından çok DNA yapısına göre sınıflandırıldığından serotipler yerine genotipler olarak ve keşfedildikleri sıraya göre numaralandırılmaktadır^{2,4}. Günümüzde 200'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır. HPV'lerin sınıflandırılmasında; tür orijini ve DNA hibridizasyonu ile tespit edilen viral genomlar arasındaki homolojinin derecesi önemlidir. DNA sekanslarına göre de papilloma virüslerin filogenetik sınıflandırılması yapılmıştır. Papilloma virüslerin tiplerinin, alt tiplerinin ve varyantlarının taksonomik sınıflandırılmasında ise majör viral protein L1 gen bölgesinin homolojisi göz önünde bulundurulmuştur. Birbirinden en uzak tipler de dahi %40 benzerlik görülmektedir^{4,5}.

İnsan papilloma virüsü tipleri klinik olarak da üç kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar; kanser açısından düşük riskli HPV'ler (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55 ve 62), olası yüksek riskli HPV'ler (26, 53 ve 66) ve yüksek riskli HPV'ler (16 başta olmak üzere 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82) olarak gruplandırılmaktadırlar^{6,7}.

HPV Genomu, Proteinleri ve Replikasyonu

Papilloma virüsler ikozahedral simetrik ve genomu çevreleyen 72 kapsomerli zarfsız DNA virüsleri olup,

Yard. Doç. Dr. Gülçin Alp Avcı, Hüti Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, 19030 Çorum - Türkiye, Tel. 364 223 07 30 - 3511 Email. alp.gulcin@yahoo.com
Geliş Tarihi: 30.10.2012 • Kabul Tarihi: 03.07.2013

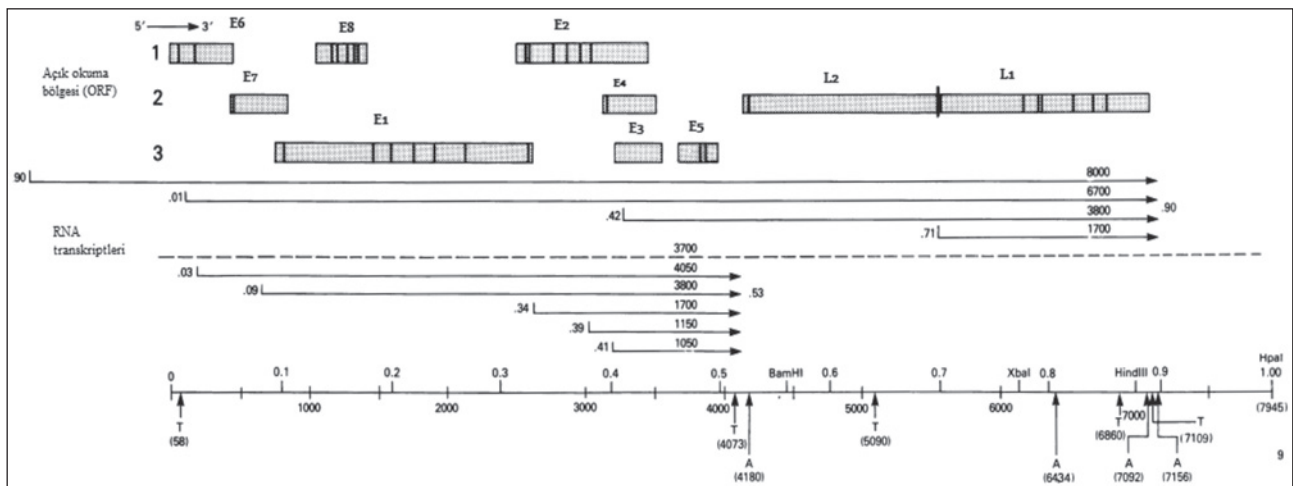
virüsün dış protein kılıfı, majör ve minör olmak üzere iki protein içermektedir. Virüsün genetik bilgisi ise yaklaşık 8.000 baz çifti içeren halkasal, çift zincirli bir DNA molekülünde kodlanmaktadır^{4,7}.

Papilloma virüsler küçük boyutlarına rağmen, moleküler yapıları oldukça karmaşık olan virüslerdir⁸. Bu yapı, fonksiyonel olarak erken bölge (early: E), geç bölge (late: L) ve uzun kontrol bölgesi (long control region: LCR) olmak üzere üç bölgeye bölünür. Tüm papilloma virüslerde bu üç bölge iki poliadenilasyon (pA) bölgesi tarafından ayrılmaktadır: Erken pA ve geç pA. Erken bölgede altı ORF (Open reading frame-açık okuma bölgesi) ve geç bölgede iki ORF bulunur. Bütün HPV ORF'leri virüsün sadece bir sarmalı üzerinde yer almaktadır ve sekiz ORF viral hayat siklusundaki gen ekspresyon sırasına göre erken ve geç olarak isimlendirilir. Erken proteinler E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 viral replikasyon ve hücre transformasyonunda rol alır^{3,8}. Son yıllarda keşfedilen E3 ve E8 de aynı bölgede oluşmakta olup, E2 bölgesinin delesyonu sırasında ortaya çıktığı düşünülmektedir^{7,9}. Geç gen bölgesinde ise L1 ve L2 kodlanmaktadır (Şekil 1). L1 geni major kapsid proteinini, L2 geni minör kapsid proteinini kodlar. Tüm bu proteinler transmembranın uyarılması, hücre siklusunun düzenlenmesi ve transformasyon aktivitesinin denetlenmesi gibi pleotropik fonksiyonlara sahiptir¹⁰.

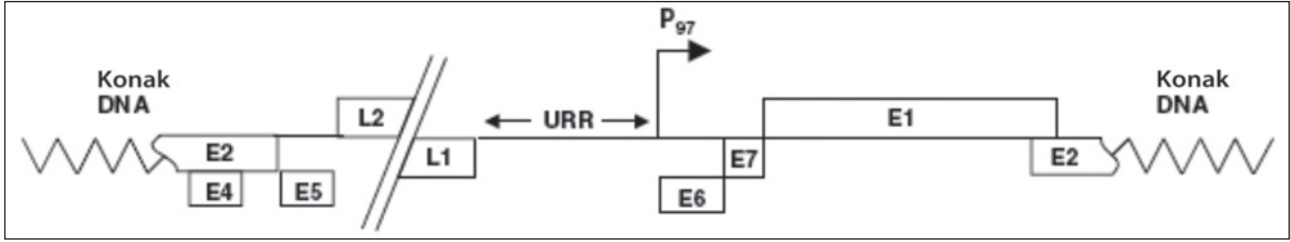
Entegrasyon genom boyunca rastgele meydana gelebilir, ancak genel olarak viral entegrasyon tipik olarak viral E1 ve E2 bölgelerinde meydana gelmektedir⁸. Bu genler viral gen ekspresyonu ve replikasyonunu düzenleyen proteinleri kodlamaktadır. E1 proteinini

viral DNA replikasyonu için önemli olan helikaz aktivitesine sahiptir ve viral replikasyonun başlamasında önemli rol oynayan bir terapötiktir. E2 proteinini aynı zamanda iki protein kodlamaktadır; bunlardan biri erken bölgenin transkripsiyonunu baskılar, diğeri ise artırır⁷. Servikal kanserin gelişiminde E2 bölgesinde sıklıkla kırılma meydana geldiğinden, HPV DNA entegrasyonu önemlidir (Şekil 2). İntegrasyon esnasında E2'de meydana gelen kırılma, E2'nin E6 ve E7 üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırarak, virüsün onkoproteinleri olan E6 ve E7 gen ürünlerinin ekspresyonunda artışa, dolayısıyla da onkogeneze yol açabilir¹¹. Ancak entegrasyon olmadan da E6/E7 genlerinin ekspresyonu gerçekleşebilmektedir^{8,12}. Bu nedenle E6 ve E7 onkoproteinleri kanser gelişimi için önemlidir. Bununla birlikte, HPV tiplerinin yüksek risk taşıması, tümör supressör proteinini p53 ve retinoblastoma (Rb) ile ilişkili olan E6 ve E7 proteinlerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

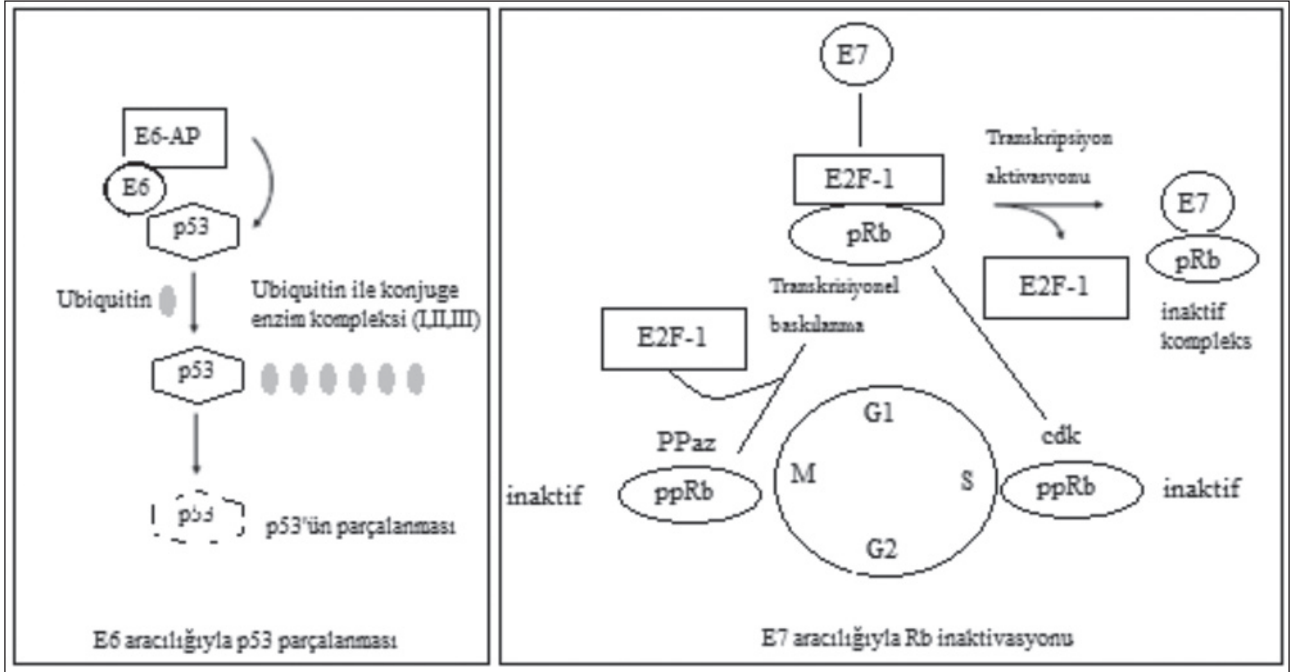
E6 proteinini iki sıra halinde birbirine bağlı 158 amino asit içermektedir. E6 proteinini, p53 ve hücrel ubiquitinasyon enzim E6-AP'yi kapsayan üçlü bir kompleksin oluşumuyla tümör supressör p53 proteininin parçalanmasını uyararak hücre proliferasyonuna teşvik eder (Şekil 3). E6 ile aktive edilen parçalanma sonucunda hücre siklusunun ilerlemesi bozularak tümör hücre gelişiminde artma gerçekleşir¹³. E6 ve E7 genlerinin transformasyon aktivitesi onların hücre siklusunda görevli hücrel proteinler ile olan etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. E7 proteinini HPV 16 ve HPV 18 gibi yüksek riskli HPV tipleri tarafından kodlanır ve Rb'ye yüksek affiniteyle bağlanır. E7



Şekil 1. İnsan papilloma virüsünün genetik yapısı¹⁰.



Şekil 2. Karsinogenezde E2 gen bölgesinde kırılma¹².



Şekil 3. Tümör supressörlerin normal fonksiyonuna engel olan Rb ile p53'e bağlanan HPV E6 ve E7 proteinleri¹³.

proteini RB'ye 'cep domaini' adı verilen bir bölgeden bağlanır. RB'nin cep domain dizisi tümör supressör fonksiyonu için önemlidir. Rb'nin önemli biyokimyasal fonksiyonlarından biri de, E2F-transkripsiyon faktörlerine bağlanmak ve replikasyonda görevli olan enzim genlerinin ekspresyonunu inhibe etmektir. Replikasyonda görevli enzim genlerinin baskılanma yeteneği, Rb'nin tümör supresyon fonksiyonu ile ilişkilidir¹⁴.

E5 proteini, enfeksiyonun başlangıcında oldukça önemlidir. Epidermal büyüme faktör reseptörü, trombositleri aktive edici büyüme faktör reseptörü ve koloni uyarıcı faktör-1 reseptörü ile bir kompleks oluşturarak hücre büyümesini uyarır. Aynı zamanda son yıllarda, E5 proteininin, apoptozisi izleyen DNA hasarında da rol oynadığı bilinmektedir¹⁵. Bundan başka, HPV enfeksiyonu ile gelişen servikal kanser lezyonlarında sıklıkla episomal viral DNA konak DNA'sına entegre olmakta ve E5 proteinini kodlayan

diziyi de içeren genomun azımsanmayacak bir parçası delesyona uğramaktadır. Bu nedenle, HPV ile ilişkili karsinogenezin geç dönemlerinde E5 zorunlu değildir^{4,8}.

E8 açık okuma bölgesi HPV-1 ve HPV-31 dışında birçok tavşan papilloma virüsünde de bir onkogen olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, HPV-1 ve HPV-31'de viral transkripsiyon ve replikasyonun bir negatif düzenleyici olarak E8-E2 füzyon proteini belirlenmiştir^{8,9}. E8 geninin bir parçası olan E8-E2 füzyon proteini, E2 geninin C terminaline bağlanmış olup, viral transkripsiyonun alternatif bir yolunu oluşturmaktadır¹⁶. E8-E2C'nin viral yaşam siklusunun erken evresi boyunca HPV DNA replikasyonunun negatif bir düzenleyicisi olduğunu düşünülmektedir^{17,18}.

Geç gen bölgesinde yer alan L1 geni, viral protein kılıfının büyük bir kısmını meydana getiren majör kapsid proteinini oluştururken, L2 geni minör kapsid

proteinini oluşturmaktadır¹⁸. L1 bölgesi yeni virüslerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Yeni bir papilloma virüs izolatu, L1 bölgesindeki DNA dizisinde mevcut papilloma virüslerden %10'dan fazla farklılık taşıyorsa yeni bir papilloma virüs olarak tanımlanmaktadır. %2–10 arasındaki farklılık veya %2'den az çeşitlilik gösteriyorsa alt tip olarak adlandırılmaktadır⁴.

Enfeksiyon ve vejetatif viral büyümenin tamamlanması keratinosit farklılaşmasına bağlıdır. Virüsler ilk olarak öncül bazal keratinositleri enfekte eder, ancak viral proteinlerin yüksek seviyede sentezi ve viral ürünlerin bir araya toplanması sadece skuamöz epitelin stratum spinosum ve granulosum tabakalarında meydana gelir¹⁹. Viral genlerin sentezi keratinositlerde meydana gelir ve keratinositlerden başka herhangi bir hücrede viral gen sentezinin meydana geldiği kanıtlanmamıştır. Bazal hücrelerde virüs enfeksiyonu ile başlangıçta düşük kopya sayısı görülür. Daha sonra viral DNA replikasyonda hücre siklusuna bağlı olarak, viral yük yaklaşık 50-100 kopya/hücre sayısına ulaşır. Enfekte hücre öncül kök hücreden ayrılarak epitelin diğer tabakalarına girer²⁰. Daha sonra viral gen ifadesi minimal düzeydedir ve özellikle E6 ve E7 onkogenlerinin ifadesi E6/E7 transkriptleri ile sıkı bir kontrol altındadır²¹. Enfekte keratinosit farklılaşan tabakalara girdiğinde, hücre döngüsünden ayrılır. Burada viral gen ifadesinin etkili bir regülasyonu söz konusudur ve viral DNA replikasyonu gerçekleşir. Viral kopya sayısı en azından 1000 kopyaya/hücreye ulaşır. Erken genler E6 ve E7'nin çok sayıda ifadesi ve geç promotordan geç genlerin ifadesi görülür^{20,21}. Hücre döngüsüyle farklılaşan hücrede meydana gelen bu olayların gerçekleşmesi oldukça önemlidir. Papilloma virüsler sadece bir DNA replikasyon enzimi, E1'i ve bundan başka viral E2 proteinini kodlar. Replikasyon tamamen hücresel DNA sentez mekanizmasına bağlıdır. Bu virüs için problem, hücresel DNA polimerazın ve replikasyon faktörlerinin mitotik olarak aktif hücrelerde üretilmesidir. Bu problemi çözmek için virüsler viral yaşam döngüsü kapsamında proteinler kodlar. Döngüsüz hücrelerde hücresel DNA sentezini reaktif eder, apoptozisi inhibe eder ve enfekte keratinositlerin farklılaşma programının geciktirilmesine yol açar²². Viral DNA replikasyonuna izin veren bir çevre oluşturur. Gerçekleştirilen detaylar tam olarak anlaşılammıştır ancak bu fonksiyonlar için viral genlerin merkezi E6 ve E7'dir. Yüksek riskli HPV replikasyonunda bu işlev sayesinde, enfekte hücrelerde büyüme kontrol edilemez ve kanser gelişimi görülür²³.

HPV Enfeksiyonunda Bulaş

İnsan papilloma virüsü birçok şekilde bulaşmaktadır; kontamine yüzeylerden, ciltteki lezyonlardan ve doğum kanalından olmak üzere direkt veya indirekt olarak bulaş görülmektedir²¹. Ancak, en önemli bulaş şekli cinsel yolla bulaştır²². Şiddetli enfeksiyonlar için, cinsel aktivite esnasında skuamöz ya da mukozal epiteldeki aşınmalar veya hasarlarla bazal hücrelere doğru HPV'nin ulaşması gerekmektedir²¹. Yapılan çalışmalarda seksüel aktif kadınların %75'inde HPV varlığı bildirilmektedir. Ayrıca genital HPV enfeksiyonu geçiren bireylerin eşlerinde de %60-66 oranında ortalama 3 ay gibi bir süre sonrasında genital HPV lezyonları görülmektedir²².

Cinsel ilişki ile bulaşmada en önemli faktörler cinsel eş sayısı ve enfeksiyonun alındığı yaştır. Özellikle ilk cinsel ilişki yaşının erken olması, HPV enfeksiyonu alınmasında ve daha sonra gelişecek malign lezyonlar açısından oldukça önemlidir²⁴. Tüm bu bilgilerin yanı sıra, serviks enfeksiyonunda genellikle cinsel ilişkinin gerekli olduğu düşünülür, ancak HPV anogenital bölgeleri de enfekte edebilir. Ayrıca, HPV'nin cinsel ilişki olmaksızın indirekt bulaş ile kontamine yüzeylerden (havlu v.s.) ve deriden deriye temasa da bulaşabileceği bilinmektedir. Nadir görülen bir durum olarak da, anneden bebeğe doğum kanalıyla fetal olabilen rekkürent solunum papillomatozis (recurrent respiratory papillomatosis, RRP) bulaşı olabileceği rapor edilmiştir²¹. Bazı çalışmalarda servikal HPV taşıyan kadınlardan doğan çocukların nazofarinks sekresyonlarında %4–87 oranında HPV DNA pozitifliği belirlenmiştir²⁵.

HPV Enfeksiyonunun Klinik Belirtileri

İnsan papilloma virüsü sadece serviks kanserlerinde değil aynı zamanda deri ve faringeal kanserler gibi diğer malignensilerle ilişkili olan vulvar, vajinal, penil ve anal kanserlerden de sorumludur²⁶. Yaklaşık 40 HPV tipinin genital mukoza enfeksiyonuna sebep olduğu bilinmektedir ve kanserojen potansiyeline göre sınıflandırılmaktadır. Düşük riskli tipler genital siğiller ve düşük dereceli genital anormallikleri içeren benign lezyonlara sebep olur. Ancak genital kanserlerde bulunmazlar. Bu nedenle “düşük riskli” olarak adlandırılırlar. Yüksek riskli tipler hem düşük hem de yüksek dereceli prekanseröz lezyonlara sebep olurlar. Bununla beraber, invaziv kanserlerde görülen tipler için “yüksek riskli” tanımlaması yapılmaktadır²¹.

İnsan papilloma virüsü enfeksiyonlarının çoğu asemptomatik olmakla birlikte değişik klinik tablolar ortaya çıkabilir³. Değişken klinik tablo, virüsün tipine (HPV 16 ve HPV 18 invaziv karsinom ile ilişkilidir), lezyonun lokalizasyonuna (respiratuvar papillomatosis gibi), bireyin immünolojik durumuna (gebeler ve immün yetmezliği olanlarda daha ağır tablo) ve epitelin doğasına (serviksin transformasyon bölgesindeki metaplazik skuamöz epitel, HPV veya diğer kofaktörlerin onkojenik etkilerine daha yatkındır) bağlıdır²⁷. Genital siğiller birkaç ayda gözlenirken, servikal kanser gelişimi yıllar alabilmektedir. Bununla birlikte, çoğu HPV enfeksiyonu asemptomatiktir ve sadece HPV DNA testi uygulandığında tespit edilmektedir. Sağlıklı bireylerde, enfeksiyonun %75'inden fazlası otuzuncu ayda belli olur. Bu durum özellikle düşük riskli tiplerde doğrulanmıştır²¹. Genital HPV enfeksiyonunun başlıca klinik aşamaları; 1. Latent, 2. Subklinik ve 3. Klinik dönemlerdir. Virüs ilk olarak bazal laminaya yakın stratum germinativumdaki hücreleri enfekte eder, bu da en çok cinsel ilişkiye bağlı mikrotravmaların olduğu bölgede oluşur. Latent dönemde hastalığın sitolojik ya da morfolojik hiçbir bulgusu yoktur, sadece ultrasensitif PCR teknikleri ile HPV DNA'sı gösterilebilir²⁸. Subklinik dönemde HPV'ye bağlı sitolojik-mikroskopik değişiklikler veya kolposkopi gibi büyütme yöntemleri uygulanarak görülebilen lezyonlar söz konusudur. Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve intraepitelyal neoplaziler genelde bu döneme oluşur. Genital kondilom ya da invaziv kanser gibi gözle görülebilen lezyonların ve belirtilerin bulunduğu dönem ise klinik dönemdir. İmmünolojik kontrolün kaybıyla virüs genomu replike olur ve buna bağlı olarak da ortaya çıkan büyüme faktörlerinin etkisiyle epitel proliferasyonu, intermediyer hücre hiperplazisi ve hiperkromazi oluşmaktadır²⁹. Normalde CIN, subklinik bir enfeksiyon olup, kapiller ve stromal proliferasyon gözle görülebilecek bir kondilom yapacak düzeyde değildir. Ancak olguların %30'unda bu proliferasyon aşırı olup, servikste gözle görülebilir ekzofitik kondilom gelişebilir. Epitel tabakası üst sıralarında HPV karakteristik bulgusu olan "koilositoz" ortaya çıkmaktadır. Koilositler malign dönüşüm gösteremeyen, ölü ya da ölmekte olan stratum granulosum hücreleridir. Koilosit nükleusu düzensiz ve virüs partikülleri ile dolu olduğu için hiperkromatiktir. Sitoplazmada çekirdeğin hemen üzerinde vakuol bulundurmaktadır. Bu koilositler aslında daha çok düşük risk grubundaki HPV enfeksiyonlarının belirteci olarak görülmektedir^{30,31}.

HPV Enfeksiyonunda İmmün Yanıt

İnsan papilloma virüsü enfeksiyonuna karşı immün yanıt, genellikle diğer viral enfeksiyonlara göre daha geç gelişir. Bunun nedeni, HPV konak immün cevabından kaçmaktadır. Bu kaçış esnasında bazı immün sistem fonksiyonlarını da baskılayabilir. Bu sebeple HPV enfeksiyonlarının iyileşmesi uzun zaman almaktadır. Yüksek riskli HPV tiplerinin temizlenmesi için gerekli olan süre yaklaşık 16–18 ay iken düşük riskli HPV tiplerinin temizlenmesi için 10 ay gibi kısa bir süre yeterlidir³. Virüs immün sistemden kaçabilmek için birçok mekanizma geliştirmiştir. Bunlardan en önemlisi replikasyon döngüsüdür. Viremi fazı içermez. Enfeksiyonun epitelyum hücrelerinin lizisine yol açmaması ve farklılaşmaya bağımlı viral protein ekspresyonunun immün sistem hücrelerinden uzakta epitelin üst tabakalarında olması doğal immün cevabın uyarılmasını azaltmaktadır. İmmün cevaptan kaçıştaki diğer önemli faktör keratinositlerin iyi antijen sunamamasıdır. Böylece adaptif immün sistemin aktivasyonu da geciktirilmektedir. Ayrıca, HPV doğal immunitiyi de engelleyen bazı mekanizmaları da içermektedir. Yüksek riskli HPV'lerde bulunan E6 ve E7 proteinleri hücre yüzeyinde MHC I ekspresyonunu azaltır, Tip-1 interferon ekspresyonunu ve sinyal iletimini de bozmaktadır³².

HPV Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemler

1. Moleküler olmayan teknikler

Moleküler teknikler dışında çıplak gözle muayene, kolposkopi, sitoloji ve histoloji gibi teknikler kullanılarak da HPV tanısına gidilebilir. Bu yöntemler arasında değerlendirilen, sitoloji ve histoloji taramaları ile HPV'nin varlığı arasında bir korelasyon olduğu belirtilmektedir. Özellikle sitolojinin kullanımı servikal kanser için bir seçim aracı olarak kabul edilmiştir.

Çıplak gözle muayene

Çıplak gözle muayenede asetik asit veya lugol iyot kullanılarak yeterli ışık kaynağı altında serviksin incelenmesi esasına dayanmaktadır. Asetik asit, HPV içeren epitel hücrelerinin beyazlatılmasını sağlarken, iyot ise hücrelerin koyulaşmasına yol açar³³.

Kolposkopi

Kolposkopi bir mikroskop ve ışık yardımıyla serviksin görüntülendiği bir işlemdir. Servikal kolposkopinin

amacı, transformasyon zonunda, serviks üzerinde ya da servikal kanalda bulunan lezyonların tanımlanması, prekanseröz serviks lezyonlarının varlığının araştırılması ve anormal pap-smear sonucunda biyopsi yapılacak alanların tespit edilmesidir.³⁴ Kolposkopi uygulanmadan önce servikse %3–5'lik asetik asit uygulanarak, hücrelerin sitoplazmasında dehidratasyona neden olunur. Benign metaplastik veya malign epitelyum gibi daha fazla nükleer yoğunluğu olan bölgeler, ısıyı alttaki stromaya geçirmek yerine daha fazla yansıtarak, pembe veya kırmızı yerine beyaz (aseto-beyaz) olarak görünür. Nükleer dansitenin arttığı, yüksek dereceli CIN lezyonlarında epitel, diğer lezyonlarda görüldüğünden daha opak olarak gözlenir³³.

Sitoloji ve Histoloji

Sitolojik yöntem, hızlı ve kolay tanıma olanağı sağlar, dokuya zarar vermez ve sık olarak hücre örneği alabilme açısından elverişlidir. Sitoloji, sadece tarama testi olup, mevcut hastalığın en son kanıtı değil, sadece diğer tekniklerle birlikte (kolposkopi ve histoloji) irdelenmesi gereken bir tanı yöntemidir³⁵. Viral enfeksiyonun varlığını gösteren sitolojik değişikliklerin Papanicolaou boyası ile saptanması servikovajinal hücrelerde tarama amacı ile bugün kullanılmaktadır. Dr. Papanicolaou tarafından ortaya atılan bu yöntem kısaca Pap smear olarak bilinmektedir³⁶. Bu test dö-külen normal hücreler ve hastalık nedeniyle sitolojik olarak değişmiş hücrelerin incelenmesine dayanan bir testtir. Gecikmiş maturasyon nükleer atipi, parakeratozis, hiperkeratozisin yanı sıra yüksek dereceli sitolojik değişiklikleri yansıtması açısından invaziv serviks kanserlerinde tanı koydurucudur³⁵.

Histolojik incelemelerde kesin tanı için gerekli olan, tarama ve muayene sonucu şüpheli bölgeden konizasyon, Loop elektrocerrahi eksizyon prosedürü (LEEP), endoservikal küretaj, LETZ (Large Excision of the Transformation Zone), punc biyopsi yöntemleriyle alınan doku örneğinin patolojik olarak incelenmesi esasına dayanan bir yöntemdir³³. Ancak bu tekniklerin duyarlılığı düşük olduğundan kesin tanı için immunolojik veya nükleik asit tanı yöntemleri kullanılmaktadır³⁶.

2. Moleküler teknikler

HPV varlığının belirlenmesi için iki ana teknik bulunmaktadır. Bunlar polimeraz zinciri reaksiyonu (PCR) ve hibrid yakalama (Hybrid Capture-HC) yöntemleridir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu nükleik asitlerin in-vitro koşullarda replikasyonu için geliştirilmiş çok yaygın olarak kullanılan bir test tüp sistemidir. Hedef DNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna izin verir. PCR amplifikasyonu sonunda hedef DNA logaritmik olarak artar ve 30 döngü sonrasında 1 milyondan fazla hedef DNA oluşturulur³⁴.

Hybrid Capture Testi

Hybrid capture testinin iki çeşidi bulunmaktadır. Bunlar birinci jenerasyon hibrid yakalama tüp testi (HCI) ve yeni olan hibrid yakalama II (HCII) testidir. Her iki test de kullanılarak yüksek riskli HPV tipleri saptanabilir ancak bu yöntemle gruplar halinde tanımlama yapılabilmektedir³⁷.

HPV mRNA'sının Belirlenmesi

Yüksek riskli HPV tiplerinde E6/E7 mRNA tespitinin, HPV DNA testinden daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Bu teknik kullanılarak öncül bir belirleyici olarak HPV'nin onkojenik aktivitesinin tespiti, taramanın etkinliğinin artmasında ve servikal lezyonun prognozunun belirlenmesinde E6/E7 mRNA'nın kullanılmasının yararlı olabileceği sonucunu ortaya koymuştur³⁸.

HPV Enfeksiyonunda Tedavi

HPV tanısı alan birey için tedavi planlanırken lezyonun yaygınlık derecesi, hastanın yaşı ve çocuk arzusu gibi birçok faktör göz önüne alınmaktadır. Buna göre en uygun tedavi yöntemi seçilebilir. Bu yöntemler arasında elektrokoterizasyon, kriyoterapi, lazer vaporizasyonu veya konizasyonu, sıcak veya soğuk konizasyon, LEEP ve histerektomi yöntemleri yer almaktadır. Eğer lezyon yaygın değil ve genç hasta ise serviks koterize edilebilir^{39,40}. Kriyoterapi ise lezyonun dondurularak tedavi edilmesi işlemidir. Isının ani düşmesine bağlı olarak intrasellüler sıvı kristalize olur, hücre membranı ve organeller parçalanır. Lezyon suda çözünür bir jelle kaplanır ve servikse uygun prob uygulandıktan sonra prob'un etrafında ani bir kartopu oluşur. Ortalama 3–4 dakika içerisinde bunun 4–5 mm'ye yayılması beklenir ve daha sonra donuk bölge erimeye bırakılıp işlem ikinci kez tekrarlanır^{40,41}. Diğer bir yöntem olan lazer vaporizasyonunda, lazer ışığı, içinde sıvı bulunan ortamlarca bol miktarda absorbe edilir. Lezyon sınırları tespit edildikten sonra 7–10

mm derinliğe kadar olan bölge silindirik şekilde vaporeze edilir. Lezyon yok olup geriye bir krater kalır. Bu krater en geç 45 gün içinde epitelize olur³⁹. Lazer konizasyonunda ise, lezyon sınırları tespit edildikten sonra lazer ışını yardımı ile konik şekilde bir parçanın çıkarılması serviksten söz konusudur. Özellikle tüm dokunun histopatolojik olarak incelenmesi gereken durumlarda tercih edilmektedir⁴⁰. Elektrokoterin serviks için hazırlanmış özel kesici tel ucu tarafından gerçekleştirilen işlem, sıcak konizasyon olarak tanımlanmaktadır. Kanamanın daha az ve postop serviks anatomisinin daha iyi oluşu soğuk konizasyona tercih sebebidir. Bistüri yardımıyla gerçekleştirilen klasik konizasyon soğuk konizasyondur. Cerrahi sınırların bozulmayıp histopatolojik tetkike engel olmayışı önemli bir özelliğidir³⁹. LEEP ise, kolposkop altında tüm transformasyon zonu görülebiliyorsa lokal anestezi altında düşük voltaj diatermi loop'u ile eksize edilebilir. Lokal anestetik 10 ml'den daha az kullanılır, kan kaybını azaltmak için de epinefrin veya vazopressin saat 3, 6, 9 ve 12 hizalarından servikse enjekte edilir. Yaklaşık 3–5 dakika sonra da tüm lezyonu eksize edebilecek büyüklükte bir loop ile eksizyon yapılır. Bu tekniğin inceleme için doku elde edilmesi ile hem tanı, hem de tedavinin aynı seansta yapılabilmesi gibi pek çok avantajı vardır. Ancak, birçok hekim tarafından, serviksin büyük bölümünün alınması sebebiyle, genç ve çocuk sahibi olmayan hastalarda LEEP tercih edilmeyen bir yöntemdir⁴². Histerektomi ise CIN'in tüm tedavi metotları arasında en yüksek başarı oranına sahiptir. İntraepitelyal veya invaziv kanser rekürrensi %1'den azdır. Histerektomi, çocuk isteği olmayan, kalıcı kontrasepsiyon isteyen, düzenli kontrollere istekli olmayan ve histerektomi gerektiren ek patolojisi olan CIN'li olgularda uygun bir tedavi şeklidir^{40,42}.

HPV Enfeksiyonunda Takip

Önlenebilir kanser tipleri arasında yer alan serviks kanserinin etyolojisinde yer alan HPV'nin belirlenmesi, invaziv kanser sıklığının ve mortalitenin azaltılmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Özellikle risk altındaki hastalarda yapılan taramalar sonucunda büyük oranda serviks kanseri önlenebilir hale gelmektedir⁴³. Buna karşın, HPV ile enfekte olan kişilerin %90'ında yaklaşık viral klirensin olduğu bilinmektedir. Bunun için belirli bir süre verilememektedir. Ancak yapılan araştırmalarda, 4–6 ay ile 1–2 yıl arasında gerilemenin gözlemlendiği belirlenmiştir. Ancak bu olguların %10'u progresse olarak intraepitelyal lezyon haline geçmekte olup, bunların da %1'i invaziv

kansere dönüşebilmektedir⁴⁴. Bu nedenle hastanın Pap smear takibi yapılması gerekmektedir.

HPV Enfeksiyonunda Korunma ve Aşılar

İnsan papilloma virüsü epitelyumda bulunur ve böylece konak immün sistemi ile minimal iletişindedir. Bu sebeple de immün cevap genel olarak kısa süreli ve geçicidir. İnsan papilloma virüsü, virüs benzeri partiküllerinin (VBP) keşfedilmesi ile birlikte profilaktik aşıların ilk jenerasyonu oluşturulmuştur³⁸. Profilaktik bivalan HPV 16/18 ve kuadrivalan HPV 6/11/16/18 aşıların klinik uygulamaları yapılarak, aşıların ciddi yan etkileri olmaksızın HPV enfeksiyonuna karşı yüksek oranda etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir⁴⁵. Profilaktik HPV aşıları primer enfeksiyona ve daha sonrasına karşı kormaktadır. Bu aşıda hedef enfeksiyonun olduğu bölgede etkin bir immün cevap oluşturularak, oluşabilecek enfeksiyonu ve reenfeksiyonu önlemektir⁴⁶. Kuadrivalan aşı, kadınlarda genital siğiller, vajinal intraepitelyal neoplazi, vulvar intraepitelyal neoplazi, in situ adenokarsinoma ve servikal kanser ile ilişkili HPV 6/11/16/18'in önlenmesi için üretilmiştir. Kuadrivalan aşıya, Amerikan Gıda ve İlaç Teşkilatı (FDA) tarafından 2006 yılının Haziran ayında, adölesan dönemden itibaren kullanılması için onay vermiştir. Bu aşı, 2007 yılı nisan ayı itibarı ile ruhsat aşamasını tamamlayarak ülkemiz ilaç pazarında da yerini almıştır. HPV 16 ve 18'e karşı koruyan bivalan aşı ise özellikle servikal kanser ve prekürsör lezyonları engellemeye yöneliktir. Oluşan antikor titresi uzun süre yüksek seviyelerde tutulabilmektedir. Bu aşının adölesan dönemden itibaren kullanılmasına FDA, 2009 Ekim ayında onay vermiştir⁴⁷. Her iki aşı da, rekombinant aşı teknolojisi uygulanarak majör kapsül (L1) proteinlerinin saflaştırılması ile elde edilen tipe spesifik VBP'leri içerir⁴⁸. Aşılar, biyolojik ürünleri veya viral DNA'yı içermediklerinden enfeksiyöz değildirler. Terapötik aşı ise daha önceden meydana gelmiş bir enfeksiyonun ortadan kaldırılması ve malign hastalığın gelişmesi yönünden koruyucu etki oluşturmaktadır. Profilaktik aşıda kullanılan antijenler ana kapsid antijeni olarak sentezlenen, DNA içermeyen VPB olup, yüksek titrede nötralizan antikor oluşturarak humoral (sıvısal) yanıtı neden olmaktadır⁴⁹. Profilaktik amaçlı antikor uyarıcı aşılar mevcut persistan enfeksiyonu elimine edemez. L1 ve L2 kapsid proteinleri bazal hücrelerde eksprese edilemez. Bu nedenle bunlar terapötik aşılar için iyi bir hedef değildir⁵⁰. Terapötik aşılar ise mevcut enfeksiyon veya neoplazi varlığında tedavi amaçlıdır²⁷. Bu

nedenle profilaktik aşıda HPV L1/L2, terapötik aşıda ise E6/E7 gen ürünlerinin kullanması, aşılarından beklenen etkilerin yerine getirilmesi açısından uygundur.

Birçok çalışmanın sonuçları incelendiğinde, HPV VBP aşılarının iyi tolere edildiği ve yüksek oranda immunojenik olduğu, ayrıca yüksek antikor titrelerine sebep oldukları, persistan HPV enfeksiyonu ve ilişkili klinik hastalığın azaltılmasında etkili oldukları bildirilmiştir. Aynı zamanda, bivalan aşı ile antikor titrelerinin süresi daha uzun olduğu belirtilmektedir⁵¹. Faz II çalışmalarında bivalan aşı, plasebo ile kontrol edildiğinde, serokonversiyon oranı 1000 kat ve doğal enfeksiyondan 80-100 kat daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir⁵¹. Persistan enfeksiyonlar için etkinlik %100 ve sitolojik anormallikler için ise %93 olarak belirtilmektedir. Faz III çalışmalarında ise, quadrivalan aşının etkinliği persistan enfeksiyonlar için %90 olarak gösterilmiştir^{51,52}.

Serviks kanserinin önlenmesi için, HPV aşılama-sınının 20 yaşından önce uygulanması gerekmektedir. Virüse maruz kalmış olan erişkinlerin aşılmasının yararlı olup olamayacağı belirsizdir. İlk cinsel birlikte-lik yaşı, özellikle gelişmiş ülkelerde giderek daha genç yaşlara inmektedir. Avrupa'da 17 yaş civarında oldu-ğu hesaplanmaktadır^{51,53}. Aşılama için optimal yaş grupları cinsel ilişkiye başlama yaşı, viral epidemiyo-loji, aşılama politikaları gibi parametreler göz önün-de bulundurulursa ülkeden ülkeye göre değişmekte-dir. İmmünolojik çalışmalar, VBP aşılarıyla 9–15 yaş grubu arasında daha yaşlılara göre daha iyi serolojik cevap alındığını göstermiştir⁵⁴. Bazı çalışmalarda aşı-ların 15–26 yaş arasında etkili olduğu gösterilmiş olsa da, etki sadece HPV-DNA negatif ve serolojik ola-rak negatif olanlarda gösterilmiştir. Buna dayanarak ABD'de FDA quadrivalan aşığı 9–26 yaş arası kulla-nım için onaylamıştır⁵⁵.

Sonuç

Sonuç olarak, serviks kanseri için majör etken ola-rak kabul edilen HPV bulaşınının tanısı günümüzde oldukça önemlidir. Serviks kanseri, “önlenbilir” bir kanser tipi olması sebebiyle diğer kanser türle-rinden ayırt edilebilmektedir. Bu nedenle HPV ile ilişkili enfeksiyonlarda özellikle tarama, erken teşhis ve erken tedavi önem kazanmaktadır. Aşı çalışmaları hakkında halkın bilinçlendirilmesi çeşitli yöntemle-ler HPV açısından pozitif bulunan hastaların, belli bir sistem içerisinde takiplerinin yapılması ve yön-lendirilmesi önemlidir.

Kaynaklar

1. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:342-50.
3. Ramael M, Gudleviciene Z, Didziapetriene J. Natural history and biological behaviour of human papillomavirus: implications for cervical cancer screening. *ACTA Med Lituanica* 2004; 11: 1-7.
4. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
5. Münger K, Baldwin A, Edwards KM et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78: 11451-60.
6. Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 2007; 111: 1-12.
7. Motoyama S, Ladines-Llave, Luis Villanueva S et al. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004; 50: 9-19.
8. Alp Avcı G. İnsan Papillomavirusunun Genomik Yapısı ve Proteinleri. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46: 507-15.
9. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286–302.
10. Howley PM. The molecular biology of papillomavirus transformation. Warner-Lambert Parke-Davis Award Lecture. *Am J Pathol* 1983; 113: 414-21.
11. Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, et al. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLOS Pathog* 2009; 5: e1000397.
12. Fehrmann F, Laimonis LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003; 22: 5201–7.
13. Yim EK, Park JS. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV- associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat* 2005; 37: 319-24.
14. Kubbutat MH, Vousden KH. Role of E6 and E7 oncoproteins in HPV- induced anogenital malignancies. *Sem Virol* 1996; 7: 295-304.
15. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* 2006;110: 525-41.
16. Fertey J, Ammermann I, Winkler M, et al. Interaction of the papillomavirus E8-E2C protein with the cellular CHD6 protein contributes to transcriptional repression. *J Virol* 2010; 84: 9505-15.
17. Stubenrauch F, Zobel T, Iftner T. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* 2001; 75: 4139–49.
18. Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2008; 39: 154-66.
19. Palefsky JM, Holly EA. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 415-28.

20. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32: 7–15.
21. Milde-Langosch K, Riethdorf S, Löning T, et al. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. *Virchows Arch* 2000; 437: 227-33.
22. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1456-60.
23. Moscicki AB. Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adolesc Health* 2005; 37: S3–9.
24. Bosch FX, de Sanjose S, Castellsague X. Understanding the origin of cervical cancer. In: Prediville W, Davies P. editors. *The Health Professional's HPV Handbook*. UK: Taylor and Francis Group; 2004: 41-54.
25. Cruickshank ME. The role of human papillomavirus in risk management. *RevGynecol Pract* 2003; 3: 229-33.
26. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 2001; 285, 2995–3002.
27. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244–65.
28. Munger K. The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci* 2002; 7: d641–9.
29. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, et al. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1066–71.
30. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, 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: 1072–9.
31. Gichangi P, Estambale B, Bwayo J, et al. Knowledge and practice about cervical cancer and pap smear testing among patients at Ketyatta National Hospital, Nairobi, Kenya. *Int J Gynaecol Cancer* 2003;13: 827–33.
32. Zarakolu IP. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2006; 37: 24-8.
33. Scott M, Nakagawa M, Moscicki B. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8209–20.
34. İyibozkurt AC, Berkman S. HPV testleri ve HPV tespitinde yeni yöntemler. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji ve Obstetrik dergisi* 2009; 2: 38-41.
35. Bradley J, Barone TM, Mahe C, et al. Delivering cervical cancer prevention services in low-resource setting. *Int J Gynaecol Obstet* 2005; 89: 21-29.
36. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 1-17.
37. Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 16-28.
38. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, et al. Overview of human papilloma virus based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. 2008; 26: 29-41.
39. Castro W, Gage J, Gaffkin L, et al. Effectiveness, safety, and acceptability of cryotherapy: a systematic literature review. *Cervical cancer prevention issues in depth 1. Alliance for Cervical Cancer Prevention* 2003; 16-30.
40. Luciani S, Gonzales M, Munoz S, et al. Effectiveness of cryotherapy treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet* 2008; 101: 172–7.
41. Ortaç UF, Ozpak E. Serviksin preinvaziv hastalığı. In: Ayhan A. editör. *Klinik Jinekolojik Onkoloji*. 6. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003;p.1-33.
42. Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi. URL: http://www.ketem.org/hangi_tarama.php. May 15.2011.
43. Jacob M, Broekhuizen FF, Castro W, et al. Experience using cryotherapy for treatment of cervical precancerous lesions in low-resource settings. *Int J Gynaecol Obstet* 2005; 89: S13-20.
44. Andersen ES, Thorup K, Larsen G. The results of cryosurgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1988; 30: 21 –5.
45. Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K, et al. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intra epithelial neoplasia and effect of HIV infection. *Cancer* 2004; 64: 6766-74.
46. Varnai AD, Bollmann B, Bankfalvi A, et al. Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: diagnostic and prognostic implications. *Oncol Rep* 2008; 19: 457-65.
47. Schiller JT, Douglas R. *Lowy Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2000; 28: 50-54.
48. Galani E, Christodoulou C. Human papillomaviruses and cancer in the post-vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 977–81.
49. Ault KA. Future II Study Group. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomized clinical trials. *Lancet* 2007; 369: 1861-8.
50. Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol* 2008; 109: 15-21.
51. Sanders GD, Taira AV. Cost-effectiveness of a potential vaccine for human papillomavirus. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 37–48.
52. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, et al. Sustained efficacy up to 4,5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 2006; 367:1247–55.
53. Bozon M. Sexuality, gender, and the couple: a sociohistorical perspective. *Annu Rev Sex Res* 2001; 12: 1–32.
54. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 1757–65.
55. FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med* 2007; 356: 1915–27.