Araştırma:

Servikal örneklerde human papillomavirus sıklığı ve genotip dağılımı

Duygu Fındık[1], Hatice Türk Dağı[1], Uğur Arslan[1], Yücel Fındık[2]

[1]Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji, Konya
[2]Konya Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi, Konya

Amaç: Servikal kanser kadınlarda ikinci en yaygın kanser tipidir ve kansere bağlı ölümlerin de ikinci en sık nedenidir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar serviks kanseri için majör risk faktörünün human papillomavirus (HPV) olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın amacı HPV DNA araştırılması için laboratuvarımıza gönderilen servikal örneklerde HPV varlığının ve genotiplerinin belirlenmesidir. **Gereç ve Yöntem:** İncelenen servikal örneklerde PCR yöntemi ile HPV DNA araştırıldı ve revers hibridizasyon yöntemi ile HPV tiplendirilmesi yapıldı. **Bulgular:** Çalışmaya alınan ikiyüzelli adet servikal örnekten 29'u (%11.6) sadece yüksek riskli, 12'si (%4.8) sadece düşük riskli ve 7'si (%2.8) yüksek ve düşük riskli birlikte pozitif olmak üzere toplam 48 (%19.2) örnekte HPV DNA saptandı. Yüksek riskli HPV genotiplerinden HPV 16 %18.7 ve HPV 30's+50's %1 2.5 oranında tespit edildi. **Sonuç:** Çalışmamızda yüksek riskli tiplerden olan HPV 16 en yüksek oranda saptanırken diğer tipler ise farklı sıklıklarda belirlenmiştir. Ülkemizde HPV DNA ve HPV tip prevalansının saptanması ve HPV aşısının kapsadığı popülasyonun belirlenmesi için benzer demografik özelliklere sahip hasta/kontrol gruplarının katıldığı ve standart bir yöntemin kullanıldığı geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Servikal kanser, HPV, genotip.

Frequency and genotype distribution of human papillomavirus in cervical specimens

Objective: Cervical cancer is the second most common type of cancer and the second most common cause of cancer-related deaths in women. Epidemiological studies have shown that human papillomavirus (HPV) is the major risk factor for cervical cancer. The aim of this study was to determine the presence of HPV DNA and HPV genotypes in cervical samples with the request of HPV DNA test. **Material and Method:** HPV DNA was investigated by PCR method in servical samples. HPV genotyping was performed by reverse hybridization method. **Results:** Out of two hundred and fifty cervical samples included in the study, HPV DNA was detected in 48 (19.2%) samples including 29 (11.6%) only at high-risk, 12 (4.8%) only at low-risk and 7 (2.8%) at high and low risk together. High-risk HPV genotypes HPV 16 and HPV 30's+50's were determined as 18.7%and 12.5%respectively. **Conclusion:** In our study, HPV 16 which is a high-risk type was detected at the highest rate while other types were detected at different rates. Comprehensive studies participating patient/control groups with similar demographic characteristics and using a standard method are needed for determininationof the prevalence of HPV DNA and HPV types and population covered by HPV vaccine in our country.

Keywords: Cervical cancer, HPV, Genotype

Giriş

Human Papilloma Virus (HPV) Papillomaviridae ailesinde yer alan zarfsız, çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Bugüne kadar 100'den fazla tür belirlenmiş ve bunlardan 40 tanesinin genital sistemde enfeksiyon yaptığı belirtilmiştir (1-3). Düşük risk HPV tipleri (örn. HPV tip 6, 11) tipik olarak benign siğillere, laringeal papilloma ve çok nadir olarak malignitelere neden olurken, yüksek risk HPV tipleri (Örn.; HPV tip 16, 18, 31, 33, 45) baş ve boyun kanserleri, serviks ve diğer genital bölge kanserlerine neden olmaktadır (4).

Servikal kanser kadınlarda kanserin ve kansere bağlı ölümlerin ikinci en sık nedenidir. Bütün kanser ölümlerinin yaklaşık %10'undan sorumludur (5,6). Servikal kanser örneklerinin %99,7'sinde HPV bulunması, HPV enfeksiyonu ve servikal neoplazi gelişmesi arasındaki etiyolojik

Genel Tıp Derg 2012;22(4):116-20

Yazışma adresi: Dr. Hatice Türk Dağı, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

E-posta: haticeturkdagi@yahoo.com

ilişkiyi desteklemektedir. HPV enfeksiyonlarının çoğunun subklinik seyretmesi ve enfeksiyonların geçici olmasından dolayı epidemiyoloji ile ilgili veriler sınırlıdır (7,8).

Yaşam boyu HPV enfeksiyon riski yaklaşık %8'dir. Ancak bu oranla kıyaslandığında kadınların küçük bir kesiminde (HPV enfeksiyonlarının %1'i) yüksek grade servikal neoplazi gelişmektedir. Bu nedenle kalıcı HPV infeksiyonlarının saptanması ve değişik yöntemlerle genotiplerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Dünya üzerinde yapılan değişik çalışmalar HPV 16, 18, 31, 33, 45 tiplerinin servikal karsinom ile en fazla ilişkisi olan genotipler olduğunu göstermiştir (9). HPV infeksiyonlarının doğal geçmişi ve transmisyonu konusundaki çalışmalarda HPV DNA genotiplemesinin yararlı olduğu kanıtlanmıştır (10, 11).

Bugün dünya çapında yapılan epidemiyolojik çalışmaların amacı, farklı HPV tiplerinin bölgesel dağılımını tanımlamak ve HPV enfeksiyonu ile sosyal gruplar arasındaki ilişkileri araştırarak bu viral enfeksiyonun epidemiyolojisi, kontrolü ve önlenmesi için anahtar bilgilere ulaşmaktır. Bu çalışmanın amacı, HPV DNA araştırılması için laboratuvarımıza gönderilen servikal örneklerde HPV DNA varlığını ve HPV genotiplerini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem

Selçuk Üniversitesi Meram ve Selçuklu Tıp Fakülteleri Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne ve Konya Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi'ne başvuran ve HPV DNA taraması ve tip tayini istenen hastaların laboratuvar sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi. Hastalardan muayene esnasında Cervex brush (Rovers Medical Devices, Holland) fırçası kullanılarak servikal sürüntü örnekleri alındı ve Cobas PCR cell collection media (Roche, USA) solüsyonu içinde Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderildi.

Servikal örneklerden viral nükleik asit izolasyonu, High Pure Viral Nükleik Asit Kiti (Roche, Germany) ile üretici firmanın önerilerine göre yapıldı. Elde edilen DNA, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile HPV Detection kit (GenID GmbH, StraBberg, Germany) kullanılarak çoğaltıldı. HPV genotipleri, sekans spesifik oligonükleotid problarla revers dot blot hibridizasyon yöntemi ile belirlendi. HPV typing: Detection and Differentiation of HPV (GenID GmbH, StraBberg, Germany) kiti kullanılarak otomatize LIPA cihazında çalışıldı. Kit, yüksek riskli tiplerden HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68,73 ve 82'yi ve düşük riskli tiplerden HPV6, 11, 40, 42, 43 ve 44'ü saptamaktadır. Ayrıca HPV16, 18, 45, 30's ve 50's tiplerini belirlemektedir.

Bulgular

Çalışmaya alınan iki yüz elli adet servikal örnekten 29'u (%11.6) sadece yüksek riskli, 12'si (%4.8) sadece düşük riskli ve 7'si (%2.8) yüksek ve düşük riskli birlikte pozitif olmak üzere toplam 48 (%19.2) örnekte HPV DNA saptandı. Pozitif olguların HPV tiplerine göre dağılımı Tablo 1'de gösterildi.

Tartışma

Servikal kanser, bütün dünyada kadınlarda görülen en yaygın ikinci kanser türü olup her yıl yaklaşık 500.000 yeni vaka tanınmakta ve vakaların yaklaşık %50'si kaybedilmektedir (12). Yeni servikal kanser vakalarının %80'denfazlası gelişmekte olan ülkelerde görülür. Türkiye'de ise serviks kanseri kadınlarda görülen kanserler arasında 9. sırada, kansere bağlı ölümler arasında ise 13. sırada yer almaktadır (13).

HPV benign lezyonlardan neoplaziye kadar değişen çeşitli hastalıklara ilişkili epitel ve mukozal yüzeyleri infekte

Tablo1: *HPV pozitif olguların genotip dağılımı*

HPV Genotipleri	Sayı	HPV pozitif (n=48) (%)	Toplam (n=250) (%)
HPV 16	9	(18.7)	(3.6)
HPV 18	1	(2.1)	(0.4)
HPV 30's	2	(4.2)	(0.8)
HPV 50's	1	(2.1)	(0.4)
HPV 16+ LR	2	(4.2)	(0.8)
HPV 16+30's	1	(2.1)	(0.4)
HPV 16+50's+LR	2	(4.2)	(0.8)
HPV 16+30's+50's+LR	2	(4.2)	(0.8)
HPV 30's+50's	6	(12.5)	(2.4)
HPV 50's+LR	1	(2.1)	(0.4)
Tiplendirilemeyen HR	9	(18.7)	(3.6)
HPV HR	29	(60.4)	(11.6)
HPV LR	12	(25.0)	(4.8)
HPV HR+LR	7	(14.6)	(2.8)
HPV DNA Pozitif	**48**		**(19.2)**
HPV DNA Negatif	**202**		**(80.8)**
TOPLAM	**250**		**(100)**

eden bir virüstür. HPV ilk olarak kutanöz siğillerin sebebi olarak tanınmıştır. Cinsel yolla bulaşan viral hastalıklar içerisinde en sık görülen ve en fazla maddi kayba neden olan HPV, skuamöz epiteliyal tümörlere neden olur. HPV infeksiyonu kadınlarda yaygın ve çoğunlukla asemptomatik olarak bulunmakla birlikte, HPV'nin servikste kanser öncesi lezyonlar ve serviks kanseri ile güçlü bir ilişkisi olduğu bilinmektedir. HPV infeksiyonu çoğunlukla kendi kendini sınırlamaktadır. Çoğu HPV infeksiyonlu kadında saptanabilir sitopatolojik bir anomali mevcut değildir. Ancak yüksek riskli HPV infeksiyonu mevcut olan bir kadında, yüksek gradeli lezyon ve servikal kanser gelişme riski artmaktadır (14,15).

HPV tipleri onkojenitelerine göre düşük, orta ve yüksek risk gruplarında sınıflandırılmaktadır.

HPV infeksiyonlarında yüksek riskli grup tip 16,18, 31, 33, 35, 39,45,51, 52,56, 58, 59, 68, 82 iken, olası yüksek riskli olanlar tip 26,53,66, düşük riskliler ise tip 6,11,40,42.43,44, 54, 61, 70, 72, 81'dir. HPV tip 16 en onkojenik tip iken, tip 18 ikinci sıradadır. Bu iki tip vakaların %70'inden sorumludur (16).

Kadınlarda HPV enfeksiyon prevalansı %2-44 arasında değişir. HPV enfeksiyon prevalansı genel olarak 20-24 yaş arası genç kadınlarda en yüksektir ve bağışıklık oluşmasıyla ilerleyen yaş ile birlikte azalma gözlenir (17). Bir meta-analiz çalışmasında dünyada normal servikal sitolojisi olan kadınlarda HPV DNA prevalansı ve genotip dağılımı araştırılmış ve HPV prevalansı %1 0.4 bulunmuştur. HPV prevalansı Afrika, Orta Amerika ve Meksika'da yüksek (yaklaşık %20-30) ve Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'da daha düşük (yaklaşık %8-11) tespit edilmiştir. Aynı çalışmada en yaygın HPV tipleri HPV-16, HPV- 18, HPV-31 HPV-58 ve HPV-52 olarak belirlenmiştir (18).

Dünyanın farklı bölgelerinde yapılmış çalışmalarda servikal sürüntü örneklerinden HPV DNA izolasyon oranları %10 ile %66 arasında değişmektedir (19-21). Domfeh ve ark. (22) Gana'da 2002 yılında 19-57 yaş arası 75 kadında PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV DNA prevalansını %10.7 oranında tespit etmişlerdir. Endonezya'da 2686 hastada yapılan araştırmada %11.4 oranında HPV pozitifliği belirlenmiş; 55 yaş üzeri hastalarda HPV prevalansı anlamlı derecede düşük saptanmıştır (23).

Ülkemizde ise HPV infeksiyonlarıyla ilgili çalışmalar belirli gruplarda ve farklı popülasyonlarda ve farklı yöntemlerle yapıldığından gerçek prevalansı belirlemek zordur. Türkiye'de son yıllarda yapılan çalışmalarda; servikal kanser örneklerinde (17,24) %92.5-93.5, servikal intraepitelyal lezyonlarda (CIN-1,2,3) (17,25,26) %71.4-73.5, atipik servikal sitolojisi olan kadınlarda (27,28,29) %44.7-55.2, normal sitoloji saptanan gruplarda %6.5-44 (13,17,26,30) HPV DNA pozitifliği bulunmuştur. Bizim çalışmamızda 250 adet servikal örnekten toplam 48 (%19.2) örnekte HPV DNA saptanmıştır.

HPV'nin yüksek riskli tiplerinin serviks yassı hücreli kanseri ve servikal intraepitelyal neoplazi ile ilişkili olması nedeniyle serviks kanseri açısından risk taşıyan kişilerin belirlenmesi ve uygun klinik takibin gerçekleştirilmesi için, rutin sitolojik taramalara ek olarak HPV enfeksiyonu varlığı ve tipinin saptanması yaklaşımı uluslararası kabul görmüştür (31). Koyuncu (32) çalışmasında normal sitoloji gösteren pap smearli kadınlarda %52.9 ile HPV 16'yı ilk sırada bildirirken, %29.1 ile HPV 18 ikinci sırada ve azalan sıklıklarla HPV 52, HPV 45'i belirlemiştir. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan bir çalışmada, HPV genotip 6 %25 oranında en sık bulunurken, genotip 16 %16,6 oranında, genotip 18, 45, 51, 56, 58, 59 ve 66 %8.35 oranında tespit edilmiştir (33). Ankara'da yapılan bir çalışmada 95 yüksek riskli HPV, 39 düşük riskli HPV ve tip tayini yapılamayan sekiz izolat olmak üzere toplam 142 farklı izolat belirlenmiştir. Aynı çalışmada HPV-16; %33.7, HPV-52; %12.6, HPV-58; %11.6, HPV 18, 31, 35; %7.4, HPV-68; %6.3 oranında saptanırken diğer tipler daha düşük oranlarda bulunmuştur (26). İstanbul'da yapılan bir çalışmada HPV mRNA pozitif örneklerde %50 oranı ile tip 33 en sık rastlanılan tip olmuş, bunu %41 ile tip 16, %22.7 ile tip 31, %18.2 ile tip 45 ve %4.5 ile tip 18 izlemiştir (34). Bizim çalışmamızda saptanan HPV DNA saptanan örneklerin %60.4'ü sadece yüksek riskli, %25'i sadece düşük riskli ve %14.6 yüksek ve düşük riskli birlikte pozitif olarak belirlenmiştir. Yüksek riskli HPV genotiplerinden HPV 16 %18.7 ve HPV 30's+50's %12.5 oranında tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda farklı tanı yöntemlerinin kullanılması ve çalışmaların genel olarak sınırlı sayıdaki hasta gruplarında yapılması nedeniyle HPV tip dağılımında bir uyum görülmemektedir. Ancak HPV-16'nın en sık saptanan yüksek riskli tip olduğu, diğer tiplerin ise farklı sıklıklarda saptandığı söylenebilir. Aşıda yer alan HPV tip18'in

ilk sıralarda olmadığı görülmektedir. Bu yüzden ülkemizde HPV DNA ve HPV tip prevalansının ve HPV aşısında kullanılması gereken tiplerin belirlenmesi için standart bir yöntemin kullanıldığı, benzer hasta ve kontrol gruplarının katıldığı geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby: 2009;51:499-507.
2. 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.
3. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology 2004;324:17-27.
4. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. Nature Rev Cancer 2002;2:342-50.
5. Rossi PG, Ricciardi A, Cohet C, et al. Epidemiology and costs of cervical cancer screening and cervical dysplasia in Italy. BMC Public Health 2009;9:71.
6. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: the burden of HPV related cancers. Vaccine 2006:24;11-25.
7. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. Infect Dis Obstet Gynecol 2006;40470:1-5.
8. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: Epidemiology and public health. Arch Pathol Lab Med 2003;127:930-4.
9. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Real-time pcr-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. J Clin Microbiol 2003;41:3221-8.
10. Ferenczy A, Franco E. Persistant human papillomavirus infection and cervical neoplasia. Lancet Oncol 2002;3:11-6.
11. Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. Gynecologic Oncology 2006;103:12-7.
12. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002 cancer incidence. Mortality and prevalence worldwide. In IARC Cancer Base No. 5 version 2.0 Lyon: IARC Press;2004
13. Dursun P, Senger SS, Arslan H, Kuşçu E, Ayhan A. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. BMC Infect Dis 2009;9:191.
14. Freeman HP, Wingrove BK. Excess cervical cancer mortality: a marker for low access to health care in poor communities. Rockville, MD: National Cancer Institute, Center to Reduce Cancer Health Disparities, May 2005. NIH Pub. No. 05–5282.
15. Onan MA. HPV Virolojisi epidemiyoloji ve genital kanser ilişkisi. Turkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics 2009;2:1-8.
16. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJC, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM. Group-specific differentiation between high-and low risk human papillomavirus genotypes by general primermediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. J Clin Microbiol 1995;33:901-5.
17. Yıldırım D. Bölgemizde servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda onkojenik human papillomavirus genotiplerinin prevalansının belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
18. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Dis 2007;7:453-9.
19. Hopman EH, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Walboomers JM, Kenemans P, Helmerhorst TJ. High risk human papillomavirus in women with normal cervical cytology prior to the development of abnormal cytology and colposcopy. Br J Obstet Gynecol 2000;107: 600-4.
20. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. Am J Obstet Gynecol 2000;182:257-64.
21. Tachezy R, Hamsikova E, Hajek T, et al. Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18 and 33 virus-like particles. J Med Virol 1999;58:378-86.
22. Domfeh AB, Wiredu EK, Adjei AA, et al. Cervical human papillomavirus infection in Accra, Ghana. Ghana Medical Journal 2008;42:71-8.
23. Vet JN, de Boer MA, van den Akker BE, et al. Prevalence of human papillomavirus in Indonesia:a population-based study in three regions. Br J Cancer 2008;99:214-8.
24. Usubütün A, Alemany L, Küçükali T, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer specimens from Turkey. Int J Gynecol Pathol 2009;28:541-8.
25. Yavuzer D, Karadayı N, Erdağı A, Salepci T, Baloğlu H, Dabak R. Serviks kanseri ve prekanseroz lezyonlarında PCR ile HPV tiplemesi. Kartal Eğitim Araştırma Hast Tıp Derg 2009;20:1-6.
26. Şahiner F, Gümral R, Şener K, ve ark. Servikal Sürüntü Örneklerinde İki Farklı Yöntemle HPV-DNA Varlığının Araştırılması: MY09/11 Konsensus PCR ve Tipe Özgül Gerçek Zamanlı PCR. Mikrobiyol Bul 2012;46:624-36.
27. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Fırat P, ve ark. Sitolojik atipi izlenen servikal örneklerde insan papilloma virusunun polimeraz zincir reaksiyonu ve hibridizasyon yöntemleriyle saptanması ve tiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2008;42:273-82.
28. Köksal MO. Jinekoloji kliniğine başvuran hastalarda human papillomavirus sıklığının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2007.
29. Uzun Çilingir I. Servikal kanser tarama programında sitolojik patoloji saptanan hastalarda HPV DNA tayini ve tiplemesinin kolposkopik ve histopatolojik sonuclarla ve sitoloji tekrarıyla karşılaştırmalı analizi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2008.

30. Batmaz G, Çetin A, Dane C, Görgen H, Dane B. Normal ve anormal servikal smear saptanan kadınlarda HPV DNA pozitifliği. Türk Jinekolojik Onkoloji Derg 2009;1:10-4.

31. Cronje HS. Screening for cervical cancer in developing countries. Int J Gynecol Oncol 2004;84:101-8.

32. Koyuncu E. Taksim eğitim ve araştırma hastanesi, kadın hastalıkları ve doğum polikliniği'ne haşvuran hastaların servikal sitolojilerin servikal kanser risk faktörlerine göre analizi–normal ve anormal sitolojik sonuçlarda yüksek onkojenik hpv prevalansı. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Uzmanlık Tezi. İstanbul 2006.

33. Yıldırım D. Sivas Yöresinde Human Papillomavirüs İnfeksiyonlarının Araştırılması. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi. Sivas 2012.

34. Ardıç N, Öztürk O, Ergünay K, Sezer O. Servikal sürüntü örneklerinde yüksek riskli insan papilloma virus tiplerine ait e6/e7 mrna'larının ticari otomatize bir nasba sistemiyle araştırılması. Mikrobiyol Bul 2009;43:463-9.