ARAŞTIRMA

Gülhane Tıp Derg 2012; 54: 298-301

© Gülhane Askeri Tıp Akademisi 2012
doi:10.5455/gulhane.16678

Şüpheli servikal lezyonlu kadınlarda yüksek riskli HPV'lerin genotip dağılımı

Fatih Şahiner (*), Kenan Şener (*), Mehmet Yapar (*), Murat Dede (**), Nuri Yiğit (***), Berksan Şimşek (****), Ayhan Kubar (*)

ÖZET

Human papillomavirus (HPV) ile ilişkili olan servikal kanser dünya genelinde kadınlarda görülen kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır ve kansere bağlı ölümlerin önemli nedenlerinden biridir. Bu çalışmada servikal sürüntü örneklerinde HPV-DNA varlığını araştırmak için MY09/11 konsensus real-time PCR yöntemi kullanıldı. Daha sonra 12 yüksek-riskli HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 68 ve 82) için tasarlanan tip spesifik primer ve probların kullanıldığı real-time PCR ile genotip tespiti yapıldı. Çalışmamızda, konsensus PCR ile HPV-DNA pozitif olarak değerlendirilen 106 servikal smear örneğinde toplam 131 HR-HPV izolatı saptandı. En sık rastlanan tipler HPV-16; 53 (%40,5), HPV-52; 17 (%13) ve HPV-58; 14 (%10,7) olarak belirlendi. Ayrıca, geriye dönük veri incelenmesiyle hastaların 44'üne (%41,5) tanısal amaçlı endoservikal biyopsi uygulandığı belirlendi. Farklı patolojik tanılara göre tip dağılımları ayrıca değerlendirildi. Günümüzde geliştirilen HPV aşıları özellikle HPV-16 ve HPV-18'e karşı koruyucudur. Bu çalışmada saptanan tiplerin yarısından fazlası (%51,9) HPV-16 ve HPV-18 dışındaki tiplerdi. Tarama panelinin HR-HPV tiplerinin tamamını içermediği dikkate alındığında HPV-16 ve HPV-18'in daha az oranda saptanması muhtemeldir. Bu nedenlerden dolayı ülkemizde HPV aşılarının koruyucu etkinliğinin öngörülmesi için geniş çaplı çalışmalarla gerçek tip dağılımının belirlenmesine gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: *HPV, genotip, real-time PCR, servikal kanser*

SUMMARY

The genotype distribution of high risk HPVs in women with suspected cervical lesions

Cervical cancer is associated with Human papillomavirus (HPV) and is the second most frequently occurring cancer among women and a major cause of cancer mortality worldwide in women. In this study, we used MY09/11 consensus real-time PCR to investigate the presence of HPV-DNA in the cervical smear samples. Secondly, we carried out genotyping analysis using real-time PCR with type-specific primers and probes were designed for the 12 high-risk HPVs (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 68 and 82). We detected 131 HR-HPV isolates in 106 cervical smear samples that were determined as HPV-DNA positive by consensus PCR. The distribution of the most frequent high-risk HPV types as follows: HPV-16; 53 (40,5%), HPV-52; 17 (13%) and HPV-58; 14 (10,7%). In addition, according to retrospective data, diagnostic endometrial biopsy was performed in 44 patients (41.5%). The distribution of HPV genotypes in different pathological entities was also assessed. Current HPV vaccines are designed to protect against HPV-16 and HPV-18. More than half (51,9%) of the types identified in this study are except for HPV-16 and HPV-18. HPV-16 and HPV-18 detection rate may be less than this rate, when consider that the screening panel does not contain all HR-HPV types. For these reasons, we think that large-scale studies are needed to determination of the current type distribution in our country to the prediction of protective efficacy of HPV vaccines.

Key words: *HPV, genotype, real-time PCR, cervical cancer*

* GATF Tıbbi Viroloji Bilim Dalı
** GATF Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
*** GATF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
**** GATF Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bu makalenin verileri 4. Ulusal Viroloji Kongresinde (İstanbul, 23-26 Haziran 2011) poster bildiri olarak sunulmuştur.

Ayrı basım isteği: Dr. Fatih Şahiner, GATA Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Etlik-06018, Ankara
E-mail: fsvirol@gmail.com

Makalenin geliş tarihi: 06.03.2012 • **Kabul tarihi:** 28.03.2012 • **Çevrim içi basım tarihi:** 27.12.2012

Giriş

İnsan papillomavirus (HPV) tipleri 52-55 nm çapında, zarfsız, 72 kapsomerden oluşan ikozahedral kapsidleri olan küçük DNA virüsleridir(1,2). Günümüzde DNA dizi homolojileri ve filogenetik farklılıklarına göre tanımlanmış olan HPV genotiplerinin sayısı 200'ü geçmiştir(2-4). Anogenital bölge enfeksiyonlarına neden olduğu saptanan HPV tiplerinin sayısı ise kırktan fazladır ve enfeksiyon etkeni olan HPV tipi kanseröz dönüşümde iyi tanımlanmış bir risk faktörüdür(5,6). HPV tipleri servikal kanser ile etyolojik ilişkilerine göre yüksek riskli (HR-HPV), muhtemel yüksek riskli (PrHR-HPV) ve düşük riskli (LR-HPV) tipler şeklinde gruplandırılmıştır(7). Servikal kanser için yüksek riskli olduğu bilinen HPV tiplerinin diğer anogenital kanserler (vulvar, anal ve penil kanserler gibi), bazı baş-boyun yassı hücreli kanserleri ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir(3) Ayrıca, bazı çalışmalarda HPV tiplerinin akciğer, kolon ve meme kanserleri ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür(3,8).

HPV dünya genelinde yaygın bir enfeksiyon etkenidir ve enfekte kişilerin çoğunda klinik tanıya götüren patolojik değişikliklere neden olmadan bulunur(5). HR-HPV enfeksiyonunun başlangıcı ile servikal kanser gelişimi arasında uzun süren bir latentlik döneminin olması nedeniyle servikal kanserler tarama programları ile henüz erken evrelerde iken saptanabilmektedir. Öyle ki, gelişmiş ülkelerde servikal kanser insidansı tarama programları ile önemli ölçüde azaltılmıştır(3). Kullanımı en yaygın olan tarama testleri pap-smear ve HPV-DNA saptama testleridir(9,10).

Bu çalışmada, hastanemizde HPV enfeksiyonlarında saptanan HR-HPV tip dağılımını belirlemek ve böylece servikal kanserleri önlemeye yönelik uygulanan HPV aşılama programlarının ülkemizdeki olası etkinliğinin öngörülmesine yardımcı olabilecek epidemiyolojik verilere katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Ocak 2009 - Mayıs 2011 tarihleri arasında, jinekolojik muayenelerinde HPV enfeksiyonunu düşündüren şüpheli servikal lezyonları olan ve MY09/11 genel primerleri ile HPV-DNA pozitifliği saptanan kadınlara ait 106 servikal smear örneği dahil edildi. Tiplendirme analizleri 12 yüksek riskli (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 68 ve 82) HPV tipi için dizayn edilen tip spesifik primer ve probların kullanıldığı real-time PCR metodu ile yapıldı. Real-time PCR testi için ince duvarlı ve real-time PCR cihazının optik okuyucusu için uygun olan 0,2 ml'lik tüpler içinde PCR karışımı hazırlandı. Toplam 20 µl hacimde hazırlanan tip spesifik PCR karışımı; 1,25 U hot start taq DNA polimeraz (Bioron, Almanya), her bir primerden 10 pmol, TaqMan prob 2,5 pmol, dNTP miksden 0,2 mM ve 2 mM $MgCl_2$ içerecek şekilde hazırlandı. Konsensus PCR reaksiyonlarında ise bu karışımdan farklı olarak prob kullanılmazken, 1X final konsantrasyonda SYBR green kullanıldı. Reaksiyon karışımına son olarak 5 µl ekstrakte DNA ilave edildi ve PCR reaksiyonları her bir örnek için son hacim 25 µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Amplifikasyon döngüleri: 95°C'de 10 dk 1 döngü (Hot start *Taq* DNA polimeraz aktivasyonu için). Takiben 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dk olmak üzere 40 döngü şeklinde gerçekleştirildi (11). Tüm işlemler ve analizler ABI PRISM 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi.

Bulgular

Yaş aralığı 16-59 ve yaş ortalaması 35,5 olan hastaların 84'ünde (%79,2) tek, 19'unda (%17,9) 2 ve 3'ünde (%2,8) 3 tip olmak üzere toplam 131 HR-HPV tipi saptandı. En sık saptanan HR-HPV tipleri sırasıyla HPV-16; 53 (%40,5), HPV-52; 17 (%13), HPV-58; 14 (%10,7), HPV-31; 11 (%8,4), HPV-18; 10 (%7,6) ve HPV-35; 8 (%6,1) olarak belirlendi (Tablo I). Tiplendirme paneline sonradan eklenen HPV-68 ve HPV-82 panele eklendikleri dönem sonrası dikkate alındığında 57 HR-HPV tipi içinde HPV-68; %8,8 ve HPV-82; %5,3 oranlarında saptandı.

Çalışmaya dahil edilen 106 hastanın patolojik değerlendirme sonuçları retrospektif olarak incelendi ve hastaların 44'üne (%41,5) tanısal amaçlı endoservikal biyopsi (ESB) uygulandığı belirlendi. ESB incelemelerinin 13'ü (%29,5) normal olarak değerlendirilirken 3 hastada (%6,8) kondilomatöz lezyon (bir verrüköz kondilom, iki düz kondilom), 27 (%61,4) hastada preinvaziv lezyon ve bir hastada (%2,3) invaziv skuamoz hücreli kanser varlığının raporlandığı belirlendi. Preinvaziv ve invaziv lezyonlarda saptanan HR-HPV tipleri aşağıda ayrıntılı olarak gösterilmiştir (Tablo II).

HPV-16/HPV-18 dışındaki HR-HPV tiplerinin görülme sıklığı tüm örneklerde %51,9 ve ESB sonuçlarına göre preinvaziv ve invaziv lezyon varlığı saptanan hastalarda %37,8 olarak bulundu.

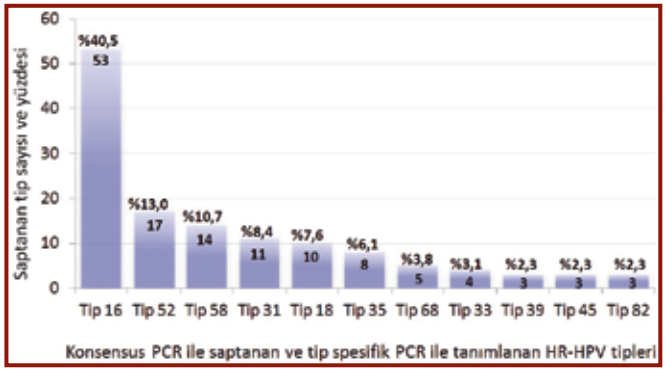
Çalışmamızda ESB yapılan 44 örnekten kondilom tanısı konan üçü değerlendirme dışı bırakıldığında tek HR-HPV saptanan örneklerde preinvaziv-invaziv lezyon saptanma oranı %62,5 olarak bulunurken,

Tablo I. Smear örneklerinde saptanan HR-HPV tipleri ve ko-enfeksiyon paternleri

Tekli enfeksiyonlar (n=84)		*Çoklu enfeksiyonlar (n=22)*			
		İki HR-HPV (n:19)		*Üç HR-HPV (n:3)*	
Tip 16	(44)	Tip 16, 35	(4)	Tip 16, 31, 33	(1)
Tip 52	(10)	Tip 16, 18	(2)	Tip 16, 52, 58	(1)
Tip 58	(8)	Tip 18, 52	(2)	Tip 31, 52, 58	(1)
Tip 31	(6)	Tip 31, 58	(2)		
Tip 18	(3)	Tip 39, 68	(2)		
Tip 35	(3)	Tip 45, 52	(2)		
Tip 68	(3)	Tip 16, 33	(1)		
Tip 82	(3)	Tip 18, 31	(1)		
Tip 33	(2)	Tip 18, 58	(1)		
Tip 39	(1)	Tip 18, 35	(1)		
Tip 45	(1)	Tip 52, 58	(1)		
Toplam izolat/(örnek)	84/(84)		38/(19)		9/(3)

Tablo II. Çeşitli preinvaziv ve invaziv servikal lezyonlarda saptanan HPV izolatları

	CIN-1 (n:9)	*CIN-2/3 (n:18)*	*İnvaziv kanser (n:1)*	*Toplam izolat*
Tip 16	5	12	1	18
Tip 18	2	3		5
Tip 31		1		1
Tip 33		1		1
Tip 35		3		3
Tip 52	3	2		5
Tip 58	2	1		3
Tip 82		1		1
Toplam izolat	12	24	1	37



Şekil 1. Tüm örneklerde saptanan HR-HPV izolatlarının sayısal dağılımı

birden fazla HR-HPV genotipi saptanan örneklerde %88,8 olarak bulunmuştur.

Tartışma

HR-HPV enfeksiyonlarının %10'unun persiste olduğu ve bunların da %1'inin invaziv kansere dönüştüğü bildirilmektedir(12). Asemptomatik kadınlarda, preinvaziv lezyonlarda ve servikal kanser olgularında saptanan HPV tiplerinin sıklığı değişmekle beraber HPV-16 yüksek riskli HPV tiplerinden en yaygın olanıdır(3). Geçmiş yıllarda yapılan çalışma verilerine göre servikal kanser olgularının yaklaşık %70'inde HPV-16 ve HPV-18 beraber sorumlu iken geriye kalan vakaların neredeyse tamamında diğer HR-HPV tipleri etken olarak bildirilmiştir(3). Son zamanlarda yapılan genotip bazlı prevalans çalışmalarının bazılarında HPV-18 dünya geneline göre daha az sıklıkta saptanmıştır (13-15). Çalışmamızda HPV-16 yanında HPV-52, HPV-58, HPV-31 ve HPV-68'in de yüksek oranlarda görülmesi dikkat çekicidir ve saptanan tiplerin yarısından fazlası HPV-16/HPV-18 dışı HR-HPV tipleridir. HPV-68 ve HPV-82'nin tarama paneline sonradan eklenmiş olması ve tarama panelinde yer almayan diğer HR-HPV ve PrHR-HPV tiplerinin varlığı göz önüne alındığında HPV-16 ve HPV-18'in görülme oranının daha da düşmesi muhtemeldir. Çalışmamızda da ortaya konulduğu gibi farklı HR-HPV izolatları çeşitli preinvaziv lezyonlara neden olmaktadır ve HR-HPV tiplerinden her hangi biri ile oluşabilen bu preinvaziv lezyonların invaziv kansere dönüşme riski bulunmaktadır. Her ne kadar çalışma grubumuz küçük de olsa yeni geliştirilen HPV aşılarının özellikle yüksek riskli tiplerden HPV-16 ve HPV-18'e karşı etkili olduğu ve HPV genotipleri arasındaki antijenik ilişki düşük seviyede olduğundan her tip için ayrı aşı geliştirilmesi gerektiği göz önüne alındığında mevcut aşıların hastanemiz popülasyonunda saptanan HR-HPV enfeksiyonlarının yarısından fazlasını önlemede yetersiz kalacağını söyleyebiliriz. Bazı tipler arası çapraz koruyuculuk geliştiği bildirilse de koruyuculuk düzeyi ve süresi açık değildir(3,16).

Çoklu enfeksiyonlarda HPV tiplerinin birbirleri ile olan biyolojik etkileşimleri ve bunun kanseröz dönüşüm üzerine olan etkileri tam olarak bilinmemektedir. Ancak, birden fazla HPV genotipi varlığının tekrarlayan maruziyeti yansıttığı ve hastalığın ilerlemesi için artmış risk ile ilişkili olabileceğini öne sürülmektedir(17-19). Çalışmamızda birden fazla HR-HPV genotipi saptanan örneklerde preinvaziv-invaziv lezyon saptanma oranı tek HR-HPV saptanan örneklere göre daha yüksek oranda bulunmuştur. İlk yapılan HPV çalışmalarında multiple enfeksiyonlar nadiren saptanmaktayken son 10 yılda yeni nesil testlerle yapılan çalışmalarda multiple enfeksiyon sıklığının tahmin edilenden daha yüksek oranlarda olduğu bildirilmiştir(19). Bu yönüyle bakıldığında da gelecekte tip prevalansını gösteren mevcut verilerde değişiklikler olabileceği ve HPV-16/HPV-18 dışı HR-HPV tiplerinin görülme oranlarında bir artış görülmesi beklenebilir.

Son yıllarda servikal, baş-boyun ve diğer HPV ilişkili kanserlerin tedavisi ve bu hastalıklardan korunmaya yardım edecek virolojik temelli yaklaşımlarda önemli ilerlemeler gerçekleşti. Hastalık riskine karşı tetikte olarak yapılan pap smear ve HPV-DNA testleri ile kombine edilen profilaktik HPV aşılarının yaygın kullanımı ile genital siğiller, servikal neoplaziler ve diğer HPV ilişkili neoplazilere bağlı morbidite ve mortalitenin azalacağı öne sürülmektedir(3,5). Fakat bu aşıların kitlesel etkinliğinin öngörülebilmesi toplumsal düzeyde tip dağılımlarının doğru olarak belirlenmesiyle doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle ülkemizde ve farklı coğrafyalarda uygulanacak yeni nesil aşıların, popülasyonlarda HPV durumu hakkında maksimum bilgi sağlayan ve enfeksiyonların seyrini ayrıntılı olarak izleme olanağı sunan geniş kapsamlı güncel veriler ışığında geliştirilmesi gerektiğini düşünüyoruz. Ayrıca, gelecekte terapötik aşılama ve antiviral farmasötik uygulamaların efektif ve non-toksik tedaviye olanak sağlayabileceği bildirilmektedir(3).

Kaynaklar

1. Jo H, Kim JW. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. Cancer Therapy 2005; 3: 419-34.
2. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 1995; 64: 1-378.

3. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. Nat Clin Pract Oncol 2008; 5(1): 24-31.
4. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. J Clin Virol 2005; 32 (Suppl 1): S43-51.
5. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol 2005; 32 (Suppl 1): S16-24.
6. zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. J Cancer Res Clin Oncol 1996; 122(1): 3-13.
7. 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(6): 518-27.
8. Petersen I, Klein F. HPV in non-gynecological tumors. Pathologe 2008; 29 (Suppl 2): 118-22.
9. Arvas M, Gezer A. HPV DNA Testleri. In: Arvas M, Gezer A (eds). Genital HPV. İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007: 93-106.
10. Wu S, Meng L, Wang S, Ma D. A comparison of four screening methods for cervical neoplasia. Int J Gynaecol Obstet 2005; 91(2): 189-93.
11. Yapar M, Aydogan H, Pahsa A, et al. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. Japanese J Infect Dis 2005; 58: 358-62.
12. Arvas M, Gezer A. Servikal Karsinogeneziste HPV'nin Rolü. In: Arvas M, Gezer A (eds). Genital HPV. İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007: p:29-39.
13. Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, Kosz-Vnenchak M. Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears. Acta Biochim Pol 2008; 55(4): 687-92.
14. Sigurdsson K, Taddeo FJ, Benediktsdottir KR, et al. HPV genotypes in CIN 2-3 lesions and cervical cancer: a population-based study. Int J Cancer 2007; 121(12): 2682-87.
15. Lee JH, Lee NW, Hong SW, Nam YS, Choi JW, Kim YS. Establishment of an efficient multiplex real-time PCR assay for human papillomavirus genotyping in cervical cytology specimens: comparison with hybrid capture II. Cytopathology 2011; 22(4): 261-68.
16. Dede M. Profilaktik HPV aşıları: güncel yaklaşımlar. Gülhane Tıp Dergisi 2010; 52: 148-56.
17. Bachtiary B, Obermair A, Dreier B, et al. Impact of multiple HPV infection onresponse to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. Int J Cancer 2002; 102(3): 237-43.
18. van der Graaf Y, Molijn AC, Doornewaard H, Quint WGV, van Doorn LJ, van den Tweel J. Human papillomavirus and the long-term risk for cervical neoplasia. Am J Epidemiol 2002; 156(2): 158-64.
19. Chaturvedi AK, Hormuzd A, Katki HA, et al. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. J Infect Dis 2011; 203: 910-20.