



Özgün Araştırma / Original Article

Moleküler Hpv Uygulanan Olgularda Hpv Sonuçları ile Patolojik Materyallerin Karşılaştırılması

İbrahim Halil Erdoğan¹

1 Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ad. Aydın, Türkiye ORCID: 0000-0002-5445-2649

Geliş: 12.01.2019; Revizyon: 25.01.2019; Kabul Tarihi: 04.02.2019

Öz

Amaç: Birçok kanser gelişiminde bazı HPV tipleri çok önemli rol oynamaktadır. Serviks kanserlerinin hemen tamamı HPV'ye bağlı olarak gelişmektedir. Uzun yıllardan beri serviks kanseri taramasında kullanılan PAP smear testi çok başarılı sonuçlar vermiştir. Son yıllarda rutin olarak kullanılan HPV DNA testleri prekürsör lezyonların tarama ve takibinde başarılı olanaklar sağlamaktadır. Bu çalışmada PAP smear ve eş zamanlı HPV tiplendirmesi yapılan olgulara ait bulgular değerlendirilmiştir.

Yöntemler: PAP smear ve HPV testi uygulanan 6384 hasta çalışmaya alınmıştır. Bu hastalardan 886'sında (%13,9) serviks kanseri için yüksek riskli olarak bilinen HPV tipleri bulunmuştur.

Bulgular: En sık gözlenen HPV tip 16'dır. PAP smear sonuçlarına göre normal bulunan 148 (%16,7) hastada yüksek riskli HPV tipleri bulunduğu görülmüştür. Doku biyopsisi bulunan yüksek riskli HPV pozitif hastaların normal PAP smear sonuçlarına karşın 37 tanesinde LGSIL tanısı saptanmıştır. PAP smear ile HGSIL ve malign tanısı alan olguların biyopsi sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçları PAP smear testinin özellikle yüksek dereceli prekürsör lezyonlarda daha etkili olduğunu göstermektedir. PAP smear ile normal bulunan yüksek oranda hastada yüksek riskli HPV tiplerinin bulunması dikkat çekmektedir. Bu sonuç HPV testlerinin taramada önemini, sensitif ve objektif bir test olduğunu ortaya koymaktadır. Serviks kanseri taramasında PAP smear ve HPV testlerinin eş zamanlı kullanılması, bu kanserin sıklığını ve ölüm oranlarını daha da azaltacaktır.

Anahtar kelimeler: PAP smear, HPV, serviks kanseri

DOI: 10.5798/dicletip.534860

Yazışma Adresi / Correspondence: İbrahim Halil Erdoğan, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ad. Aydın, Türkiye e-mail: ibrahimhalilerdogdu@gmail.com

Comparison Of The Pathological Materials With Hpv Results In Patients With Molecular Hpv

Abstract

Objective: Some types of HPV play a very important role in many cancers. Almost all cervical cancers develop due to HPV. The PAP smear test, which has been used for cervical cancer screening for many years, has been very successful. HPV DNA tests, which have been used routinely in recent years, provide succesful possibilities for screening and follow-up of precursor lesions.

Methods: In this study, PAP smear and concurrent HPV typing findings were evaluated. A total of 6384 patients undergoing PAP smear and HPV were included in this study. Among these patients, 886 (13.9%) had HPV types known as high risk for cervical cancer.

Results: The most common HPV type is 16. High-risk HPV types were found in 148 (16.7%) patients who were normal according to PAP smear results. In contrast to normal PAP smear results in 37 patients with high risk HPV positive tissue biopsy, LGSIL was diagnosed. PAP smear and HGSIL and malignant patients were found to be compatible with the results of the biopsy.

Conclusions: The results of this study show that PAP smear test is more effective in high-grade precursor lesions. It is noteworthy that high-risk HPV types are present in a high rate of PAP smear test normal patients. This result reveals that the importance of HPV tests in screening is a sensitive and objective test. The simultaneous use of PAP smears and HPV tests in cervical cancer screening will further reduce the incidence and mortality of these cancers.

Keywords: PAP smear, HPV, cervical cancer.

GİRİŞ

Human Papilloma Virüs (HPV) 100'den fazla tipi bulunan ve birçok kanserde rol oynadığı gösterilmiş bir DNA virüsdür. Cinsel yolla en sık bulaşan hastalık olan HPV'ye cinsel yünden aktif bireylerin %70'den fazlasında hayatlarının bir döneminde maruz kaldığı bildirilmektedir¹. Özellikle kadınlarda genital bölge (vulva, vagen ve serviks) kanserlerinde çok önemli rol oynadığı bilinen HPV, serviks kanserlerinin neredeyse tamamından sorumludur. HPV tipleri arasında serviks kanserinde yüksek riskli olarak belirlenen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ve 68) tiplerden özellikle tip 16 serviks kanserlerinde en sık gözlenen tiptir². Diğer HPV tipleri kanserlerle daha nadir ilişkilendirilmekle birlikte bölgesel farklılıklar da görülmektedir². PAP smear testi taraması, yaklaşık 30 yılda serviks kanseri insidansını %50'ye varan oranda azaltmasına rağmen, serviks kanseri kadınlarda halen kanser ölümlerinde meme kanserinden sonra 2. sırada yer almaktadır³. Çok başarılı bir tarama testi

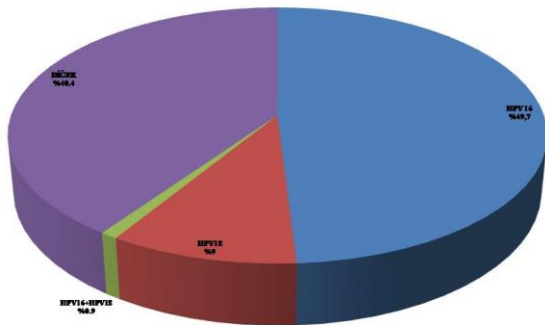
olan PAP smear değerlendirilmesinde Bethesda sistemi kullanılmaktadır. Bu sistemde yer alan bazı kategorilerde takip konusunda yaşanan sorunlar nedeniyle, bu hastalarda HPV tiplendirmesi önem kazanmıştır. Özellikle yüksek riskli HPV tespit edilmesi durumunda bu hastaların daha yakın takibi, ya da cerrahi müdahalesine karar verilebilmektedir. Son yıllarda tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de HPV taramasının servikal kanserlerin erken tanısında daha etkili bir yöntem olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır¹⁻⁶. Konvansiyonel PAP smear taramasında gözlenen değişiklikler ile refleks HPV testi istenmesine göre, günümüzde daha sıklıkla uygulanan co-test (PAP smear+HPVtiplendirme) uygulamasının daha yüksek başarı oranına sahip olduğu bildirilmektedir¹⁻⁵. Henüz tek başına HPV testinin PAP smear testinin yerini alamayacağı düşünülmele birlikte yüksek sensitivitesi nedeniyle co-test uygulamasının servikal prekanseröz lezyonların tanı, takip ve tedavisinde daha etkili bir yol olduğu kabul

edilmektedir. Bu çalışmada, sitolojik servikal örnek sonuçları ile HPV DNA çalışılan örnekler arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 2016-2018 yılları arasında bölümümüzde sıvı bazlı teknik ile PAP smear incelemesi ve HPV tiplendirmesi yapılan olgulara ait sonuçlar retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

YÖNTEMLER

Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Patoloji laboratuvarına 2016-2018 yılları arasında gönderilen ve HPV tiplendirmesi yapılan toplam 6384 materyal değerlendirmeye alınmıştır. Çalışma için etik kurul onayı ADÜ Etik Kurulu 10/01/2019 tarih, 2019/07 karar no ile alınmıştır. Olgulara ait materyaller sıvı bazlı ticari bir sistem (BD SurePath™ Pap Test, ABD) ile toplanmış ve örneklerden hazırlanan preparatlar ile Bethesda Sistemi kullanılarak servikal smear değerlendirmesi yapılmıştır. Eş zamanlı olarak aynı materyaller HPV tiplendirmesi için kullanılmıştır. İlk olarak klinik örneklerde tek reaksiyonda en fazla HPV tipini amplifiye edebilecek şekilde tasarlanan primerler ile R-PCR genel bir pozitiflik/negatiflik taraması yapılarak ve sonrasında bu testlerle pozitiflik saptanan örneklerde Pyrosequencer (QIAGEN) ile sekans analiziyle spesifik tip tayini yapılmıştır.

HPV TIPLERİNİN DAĞILIMI



Şekil 1: HPV pozitif olgularda HPV tiplerinin dağılımı.

Bunun için; DNA İzolasyonu: Servikal sıvı bazlı smear örneklerden DNA izolasyonu QIAGEN EZ1 virüs mini kit ile QIAGEN EZ1 advanced XL otomatik cihazı ile yapılmıştır. HPV DNA PCR Aşaması: Elde edilen HPV DNA'ları ve HPV pyrosequencing kitinde (QIAGEN) mevcut HPV spesifik primerler kullanılarak PCR kuruldu. Ayrıca kitte bulunan insan B-Globin geni primerleri çalışma boyunca internal kontrol olarak kullanılmıştır. PCR için mastermix hazırlanırken her bir örnek başına 20 mikrolitre AMP Buffer, 4 mikrolitre AMP nucleotide mix, 2,5 mikrolitre AMP dye, 1,5 mikrolitre HPV sign primers, 0,8 mikrolitre AMP enzim, 1,2 mikrolitre clean enzim ve 10 mikrolitre su kullanılmıştır. Örnekler Rotor Gene TM 600 cihazına aktarılarak, Rotor Gene TM 600 cihazı (QIAGEN real time PCR cyler) içerisindeki örnekler için PCR amplifikasyonları 94 derecede 1 dakika, 40 derecede 2 dakika, 72 derecede 1,5 dakika olmak üzere 40 döngü ve 72 derecede 5 dakika son uzatma olarak gerçekleştirilmiştir. Pyrosequencing: Rotor Gene 6000 amplifikasyonunun ardından Pyromark Q24 (QIAGEN) sisteminin kullandığı sentez yoluyla dizileme prensibine dayalı pyrosequencing işlemi yapılmıştır. Sekans sonucu elde edilen baz dizileriyle kütüphanedeki diziler karşılaştırılarak, pyromark sistemiyle 30 baz çifti uzunluğundaki HPV'nin aşırı değişken genom bölgesinin sekansı sağlanarak genotiplendirme gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 6384 hastanın ortalama yaşı 43,6 (18-89 yaş arası) bulunmuştur. Olguların 886'sında (%13,9) yüksek riskli HPV pozitifliği saptanmıştır. Yüksek riskli HPV pozitif bulunan olgularda ortalama yaş 44,2 (18-84 yaş arası) bulunmuştur. Yüksek riskli HPV tiplerinden en sık HPV tip 16 (%49,7) gözlenirken ikinci sıklıkta HPV tip 18 (%9) oranında görülmüştür. Olgulardan 12 tanesinde (%1,3) birden fazla HPV tipi pozitif bulunmuştur. En sık birliktelik

gösteren HPV tipleri %0,9 oranı ile HPV16+HPV 18 tipleridir. HPV sonuçları Şekil 1'de gösterilmiştir. Bethesda sistemine göre normal kategoride raporlanan 148 (%16,7) olguda yüksek riskli HPV pozitifliği saptanmıştır. Yüksek riskli HPV pozitif bulunan olgularda Bethesda sistemine göre; 353 olgu (%39,8) LGSIL, 288 olgu (%32,5) ASCUS, 49 olgu (%5,5) HGSIL, 30 olgu (%3,3) Malign Sitoloji, 18 olgu (%2) ASC-H olarak raporlanmıştır. Olgulara ait PAP smear sonuçları ile HPV tiplendirmesini gösteren sonuçlar Tablo I'de özetlenmiştir. Yüksek riskli HPV pozitif bulunan 886 olgunun 142 tanesinde doku biyopsisi ile değerlendirme sonuçlarına bakıldığında; 26 olguda SCC, 29 olguda HGSIL, 76 olguda LGSIL, 11 olguda ise normal/reaktif değişiklikler olarak raporlandığı bulunmuştur. Biyopsi sonuçlarına göre SCC ve HGSIL tanısı alan 55 olgunun tamamının sitolojik olarak Malign Sitoloji, HGSIL olarak tanı aldığı ve 49 tanesinde HPV16, 4 tanesinde HPV18, 2 tanesinde HPV16+HPV18 pozitifliği bulunduğu görülmüştür. Biyopside LGSIL olarak raporlanan olgulardan 37 tanesi sitolojik olarak normal kategoride yer alırken, 14 olgu ASCUS, 25 olgu LGSIL olarak raporlanmıştır. Biyopsisi bulunan olgulara ait bulgular Tablo II'de özetlenmiştir.

Tablo 1: PAP smear sonuçları ile HPV durumunun karşılaştırılması.

PAP SMEAR SONUCU	HPV POZİTİF	HPV NEGATİF	TOPLAM
NORMAL/REAKTİF DEĞİŞİKLİKLER	148	5155	5303
ASCUS	288	323	611
ASC-H	18	6	24
LGSIL	353	14	367
HGSIL	49	0	49
MALİGN SİTOLOJİ	30	0	30
TOPLAM	886	5498	6384

Tablo 2: PAP smear tanısına göre doku biyopsisi bulunan olguların karşılaştırılması.

DOKU BİYOPSİ TANISI	PAP SMEAR TANISI					TOPLAM	
	NORMAL /REAKTİF DEĞİŞİKLİKLER	ASCUS	ASC-H	LGSIL	HGSIL		MALİGN SİTOLOJİ
NORMAL /REAKTİF DEĞİŞİKLİKLER		11		37		48	
LGSIL		14		25		39	
HGSIL					23	6	29
SCC					5	21	26
TOPLAM		25		62	28	27	142

TARTIŞMA

Günümüzde serviks kanseri gelişiminde HPV'nin mutlaka var olması gerektiği kabul edilmektedir[1]. Serviks kanseri görülme sıklığı, özellikle PAP smear tarama programının gelişmesi ile tüm dünyada çok belirgin bir şekilde azalmıştır. Ancak halen kadınlarda kanser ölümlerinde ikinci sırada yer almaktadır¹⁻⁷. ABD gibi gelişmiş sayılan bir ülkede dahi, 2018 yılında 13000'den fazla yeni servikal kanser hastası ile 4000'den fazla kadının bu kanserden öldüğü bildirilmiştir². Bu olguların hemen tamamının da HPV nedeniyle olduğu tespit edilmiştir. Serviks kanseri ileri evrelere kadar çok fazla semptom vermemesi ve zor tedavisi nedeniyle oldukça kötü prognoza sahiptir. Bu nedenle prekanseröz lezyonların tanınması için kullanılan tarama programları büyük öneme sahiptir. Bu tarama programlarından en önemlisi şüphesiz PAP smear değerlendirmesidir. Yarım asırdan uzun süreden beri başarı ile kullanılan, serviks kanseri görülme ve ölüm oranlarını yarı yarıya azaltan PAP smear testlerinin değerlendirmesi günümüzde modifiye Bethesda sistemi ile yapılmaktadır. Bu sistemde yer alan ve prekürsör lezyonları tanımlayan bazı kategorilerde yer alan hastaların takip ve tedavisinde tam bir konsensus henüz sağlanamamıştır. Son yıllarda tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın bir şekilde

uygulanmaya başlanan HPV tiplendirme testleri sayesinde servikal prekürsör lezyonlara yaklaşımda değişiklikler yaşanmıştır. Özellikle serviks kanseri latent döneminde hiçbir sitolojik ya da morfolojik bulgusu bulunmayan dönemde HPV'nin gösterilmesi ile bu hastaların takibinde yeni yaklaşımlar ortaya çıkarmaktadır. Serviks kanseri tarama testleri arasında en objektif ve tekrarlanabilir olan HPV DNA tespitinin daha sensitif olduğu gösterilmiştir⁸⁻⁹. Önceki dönemlerde, konvansiyonel smear test sonuçlarına göre şüpheli olgularda refleks test olarak daha sonradan istenen HPV testinin günümüzde servikal smearlerin sitolojik incelemesi ile eş zamanlı olarak değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir. "American Society of Colposcopy and Cervical Pathology" (ASCCP) ve "American College of Obstetricians and Gynecologists" (ACOG) birlikleri, 30-65 yaş arasında kadınlarda, co-test olarak adlandırılan bu yöntem ile, beş yılda bir tarama önermektedir²⁻³. Yapılan çalışmalar co-test kullanımının servikal kanser taramasında servikal smear değerlendirilmesinde yaşanabilecek olan yanlış negatif ya da yanlış pozitiflik oranlarını belirgin oranda düşürdüğünü göstermektedir¹⁰⁻¹². Özellikle Bethesda sisteminde ASCUS ve AGUS kategorisinde yer alan olguların takip ve tedavisinde co-test uygulaması ile daha etkili yaklaşımlar yapılacağı kabul edilmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre yüksek riskli HPV pozitifliği bulunan ancak servikal sitoloji ile normal kategoride raporlanan yaklaşık %17 gibi bir oranda olgu bulunmaktadır. Bu sonuç bu olgularda önerilen tarama programlarının aksamasına yol açabilecek oranda önemlidir. Biyopsi ile değerlendirilen olgularda malignite ve yüksek dereceli displazi bulunan olgular ile servikal sitoloji sonuçları her ne kadar yüksek korelasyon gösterse de, bir tarama programı olan ve prekürsör lezyonların belirlenmesini amaçlayan servikal sitolojik materyallerde HPV değerlendirmesinin de eklenmesiyle amaca daha uygun sonuçlar alınacağı görülmektedir.

Çalışma sonuçlarına göre sitolojik olarak normal kategoride olup biyopside LGSIL tanısı alan 37 olgu bulunması HPV belirlenmesinin bu gibi olgularda yanlış negatif sonuçları engelleyebileceğini ortaya koymaktadır. Son yıllarda giderek artan oranda kullanılan ve ulusal sağlık programlarında tarama amacıyla da yer edinen HPV DNA belirlenmesinin, özellikle prekürsör lezyonların tespitinde çok önemli yer tuttuğu çalışma sonuçlarımızla da desteklenmektedir. Servikal kanser taraması amacıyla kullanılan PAP smear ve HPV DNA testinin eş zamanlı co-test şeklinde uygulanması, ülkemiz koşullarında hastaların zamanında tespit edilebilmesi, yalnızca negatifliklerin azaltılması açısından daha etkili olacaktır. Özellikle sitolojik materyallerin değerlendirilmesinde yaşanan teknik sorunlar ve değerlendiren kişiye bağlı değişkenlerin azaltılarak, objektif ve sensitif bir test olan HPV DNA testinin tarama programlarında uygulanması ile servikal kanser görülme ve ölüm oranlarının daha da düşürülebileceği görülmektedir.

Sonuç olarak; PAP smear değerlendirmesi halen servikal kanser taramasında çok değerli bir yöntem olarak görülmekle birlikte co-test olarak adlandırılan eş zamanlı HPV DNA değerlendirmesi ile birlikte gerek tanı gerekse de olguların yönetiminde çok daha faydalı olacaktır. Bu çalışma sonuçları ülkemiz genelinden daha yüksek oranda HPV pozitifliği göstermekle birlikte, HPV pozitifliğinin gerçek oranlarının, bölgesel farklılıklarının ve HPV alt tiplerinin dağılımının belirlenebilmesi için geniş olgu serileri ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma herhangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

1. Aydođdu SGM, Özsoy Ü. Serviks kanseri ve HPV. *Androl Bul* 2018; 20: 25-9.
2. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colpos copy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 147-72.
3. Committee on Practice Bulletins—Gynecology. ACOG Practice Bulletin Number 131: Screening for cervical cancer. *Obstet Gynecol* 2012; 120: 1222-38.
4. Erođlu C, Keşli R, Eryılmaz MA, et al. Serviks kanseri için riski olan kadınlarda HPV tiplendirmesi ve HPV sıklığının risk faktörleri ve servikal smearle ilişkisi. *Nobel Med* 2011; 7: 72-7.
5. Akay E, Tekelioglu F, Karaman H. Concordance of the frequency, typing, and results of high risk human papilloma virus in cervical cytology materials with biopsy: Retrospective analysis of 5604 patients. *Annals of Medical Research* 2019; 1: 1-5.
6. T. C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2015. Yayın No:1054. Ankara: Sistem Ofset Basım Yayın; 2016. ss.36-7.
7. Altun E, Usta A, Bülbül ÇB, et al. HPV-DNA Alt Tiplerinin Smear ve Kolposkopik Biyopsi Sonuçlarının Korelasyonunun Değerlendirilmesi. *Van Tıp Derg* 2018; 25: 472-76.
8. Huh WK, Ault KA, Chelmow D, et al. Use of primary high-risk human papilloma virus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. *Obstet Gynecol* 2015; 125: 330-37.
9. Akcalı S, Goker A, Ecemis T, et al. Human papilloma virus frequency and genotype distribution in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 503-06.
10. Dursun P, Ayhan A, Mutlu L, et al. HPV types in Turkey: multi center hospital based evaluation of 6388 patients in Turkish gynecology oncology group centers. *Turk Patoloji Derg* 2013; 29: 210-16.
11. Bayram A, Derici YK, Yılmaz NO, et al. Prevalence of high-risk human papilloma virus in women from Turkey. *Clin Obstet Gynecol Reprod Med* 2015; 1: 84-6.
12. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papilloma virus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol* 2011; 12: 663-72.