

Sivas Bölgesinde Yaşayan Kadınlarda Servikal Örneklerde Human Papillomavirüs Pozitifliği ve Genotiplerinin Sıklığı

Dilara YILDIRIM^{a1}, Malik Ejder YILDIRIM², Mustafa Zahir BAKICI³

¹Sivas Numune Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sivas, Türkiye

²Sivas Devlet Hastanesi, Moleküler Genetik, Sivas, Türkiye

³Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada amacımız, yöremizdeki HPV DNA genotiplerinin sıklığını belirlemek, servikal sürüntü ile sonuçlar arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamız, yaşları 21 ile 67 arasında değişmekte olan 140 kadın olgu üzerinde yapıldı. Hastalardan alınan servikal örneklerde PCR yöntemi ile HPV DNA araştırıldı ve Otomatize HybriMax cihazında revers hibridizasyon yöntemi ile HPV genotiplendirilmesi yapıldı. Ayrıca servikal fırça ile alınan smearlar lam üzerine yayıldı ve incelenmek üzere hastanemiz patoloji laboratuvarına gönderildi.

Bulgular: Çalışmamızda, olguların % 6,4'ünde HPV DNA pozitifliğine rastlandı. HPV genotip 6, % 25 oranında en sık bulunurken ikinci sıklıkta genotip 16, % 16,6 oranında rastlanmıştır. Bu hastaların patoloji negatifliği ve HPV pozitifliği % 77,8 oranındadır. Smear sonuçlarına göre smear negatif olan hastaların %94,7'sinde HPV negatif, %5,3'ünde pozitif bulunmuştur. Kondiloma aküminatalı hastaların %33,3'ünde HPV negatif, %66,7'sinde HPV pozitifdir. Vajinal intraepitelyal neoplazi (VIN) tanısı konan hasta bir tane olup, HPV negatif olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: Yöremizde tespit ettiğimiz HPV DNA pozitifliği yüksek bir orandadır. Sitolojik takibin yanında moleküler testler de takipte oldukça önemlidir. Moleküler çalışmalar, gelecekte ülkemizde rutin aşılama çalışmalarında kullanılacak genotiplerin önceliğini belirlemede yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Human Papilloma Virüs, Sitoloji, Genotip.

ABSTRACT

Human Papillomavirus Positivity and Frequency of Genotypes in Servical Samples of Women Living in Sivas Region.

Objective: Our aim in this study, is to determine the frequency of human papilloma virus DNA and its genotypes, and to evaluate the association between servical smear and results.

Materials and Methods: Our study was realised with 140 women who is between 21 and 67 years. HPV DNA was researched with PCR method in servical smears of patients and HPV genotyping was carried out with reverse hybridization procedure in HybriMax (HybriBio). Then, smears taken with servical brush were spreaded on slides and they were sent to pathology department for examining.

Results: In our study, % 6,4 of case have HPV positiveness. In our study, the most frequent genotype of HPV is HPV type 6 (%25). The second is HPV 16 (%16,6). The ratio for pathologic negativity and HPV positiveness is %77,8. It were detected that %94,7 of the patients with smear negative are HPV negative and %5,3 of them are HPV positive. %33,3 of the patients with condylomata accuminata are HPV negative, %66,7 of them are HPV positive. Patient diagnosed as VIN is only one and detected HPV negativity.

Conclusion: The degree of HPV DNA positivity which we detected in our region is high. In addition to cytologic evaluation, molecular techniques are also important for following the disease. Molecular works will be useful to determine the priority of genotypes that will be use for routine vaccination in our country, in future.

Key Words: Human Papilloma Virus, Cytology, Genotype.

Papillomavirüsler insanlar da dahil olmak üzere değişik canlı türlerini infekte eden zarfsız, çift zincirli DNA virüslerinin önemli bir kısmını kapsamaktadır. Bu virüsler 16 genus içermekte olup bunlardan beş tanesi (alfa, beta, gama, mu, nu) insan papillomavirüsleridir (HPVs). HPV enfeksiyonu asemptomatik olabilir veya insan mukoza ve kutanöz epitelinin benign veya malign lezyonlarını indükleyebilir. HPV'nin anogenital, özellikle servikal kanserlerin ve orofarengial karsinomların bir etiyolojik ajanı olduğu gösterilmiştir (1, 2).

Günümüzde moleküler teknoloji destekli epidemi

yolojik çalışmalar HPV enfeksiyonlarının servikal kanser gelişimindeki ana rolünü kanıtlamıştır (3). İki erken HPV geninin (E6 ve E7) tümör oluşumunda temel rol oynadıkları bilinmektedir. E6 geni p53 e bağlanır ve onun translokasyonunu önler. Böylelikle p53 ün hedef genleri etkilemesini inhibe eder (4). HPV nin onkojenik tipleri ile enfeksiyon, servikal kanser ve onun prekürsörü neoplazilerde temel etyolojik faktördür (5). Servikal kanser olgularının %90-99'unda örneklerden HPV DNA izole edilebilmektedir (6). HPV tipleri invazif malignensilerle ilişkileri temelinde sınıflandırılmaktadır (7).

^a Yazışma Adresi: Dr. Dilara YILDIRIM, Sivas Numune Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sivas, Türkiye
e-mail: nidimay@gmail.com

Geliş Tarihi/Received: 13.09.2012

Kabul Tarihi/Accepted: 06.11.2012

Yüzden fazla HPV genotipi sınıflandırılmıştır ve tıbbi önemi olan anogenital kanserlerle ilişkili tipler alfa papilloma virus genusundandır. HPV 16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 ve 59 insanlar için karsinojenik olarak sınıflandırılmıştır. HPV genotip 6 ve 11 insan karsinogenitesi açısından “sınıflandırılmayan” olarak adlandırılmışlardır (8).

Hücrel immunitenin baskıda olduğu kişilerde HPV lezyonları daha yüksek oranlarda görülür. İmmün supresyon latent enfeksiyonların aktivasyonuna yol açar veya aktif enfeksiyonların reinokülasyonu söz konusu olur ve aşık lezyonlar ortaya çıkar (9). Bu çalışmada amacımız, bölgemizdeki genotiplerin sıklığını belirlemek, servikal sürüntü ile sonuçlar arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma öncesi Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Sivas Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı.

Aralık 2009 – Mart 2010 tarihleri arasında, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran hastalardan rutin Pap smear ve HPV DNA için örnekler alındı. Servikal örnek numuneleri menstrüasyon döneminde olmayan, üç gün öncesine kadar vaginal tedavi uygulanmamış, test öncesinde vaginal asetik asit ve lugol solusyonu uygulanmamış, 24 saat içerisinde cinsel aktivitede bulunmamış olan hastalardan seçildi. Smearler servikal fırça (servibrush) ile alındı, lam üzerine yayıldı ve incelenmek üzere hastanemiz patoloji laboratuvarına gönderildi. Patoloji laboratuvarında hematoksilen+eozin boyası ile boyanıp Bethesda 2001 ve Pap Class sistemi ile değerlendirildi.

Hastalardan muayene esnasında servikal HPV DNA'nın saptanması için Female Swab Specimen Collection Kiti (HybriBio, HongKong) kullanılarak sürüntü örnekleri alındı ve hastanemiz Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirildi. HPV GenoArray Test Kiti (HybriBio, HongKong) ile genomik DNA izole edildi. Amplifikasyon için HybriBio PCR kiti kullanıldı. Otomatize HybriMax (HybriBio, HongKong) cihazıyla revers hibridizasyon yöntemi ile karsinojenik riskli (16, 18, 31, 35, 33, 39, 45, 51, 52,56, 58, 59, 68, 73, 82), sınıflandırılmayan riskli (6, 11, 40, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) ve olası karsinojenik riskli (26, 53, 66) olan 21 HPV genotipi, biotin ve pozitif kontrolün olduğu HybriMemHPV21 membran stripleri ile çalışma yapıldı.

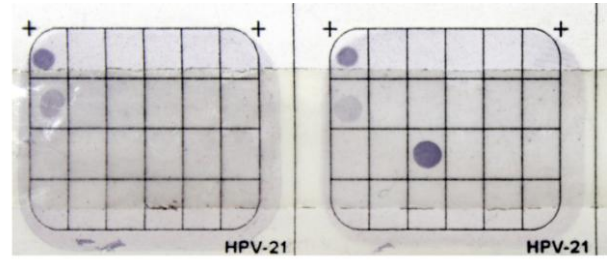
Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Windows 15,0, Khi kare testi ve iki yüzde arasındaki farkın önemlilik testi kullanılarak yapıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p \leq 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamız, Aralık 2009–Mart 2010 tarihleri arasında, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniklerine postkoital kanama ve akıntı şikayetleri ile başvuran, yaşları 21 ile 67 ($39,56 \pm 110,90$) arasında değişmekte olan 140 kadın olgu üzerinde yapılmıştır.

Karsinojenik riskli (16, 18, 31, 35, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 73, 82), sınıflandırılmayan riskli (6, 11, 40, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) ve olası karsinojenik riskli (26, 53, 66) 21 HPV genotipin araştırıldığı çalışmamızda, olguların %6,4'ünde HPV DNA pozitifliğine rastlandı.

Çalışmamızda HPV genotip 6 %25 oranıyla en fazla tespit edilirken, tip 16 %16,6, tip 18 % 8.35, tip 45 %8.35, tip 51 %8.35 (Şekil 1.) tip 56 %8.35, tip 59 %8.35, tip 58 %8.35, tip 66 %8.35, oranında görülmüştür. Sitolojik olarak normal hastalarda HPV DNA pozitiflik oranı %77,8'dir.



Şekil 1. HPV Negatif ve HPV Genotip51 Pozitif Test Membran Stripleri

Smear sonuçlarına göre smear negatif, HPV negatif hasta %94,7 iken, %5,3 hastada smear negatif, HPV pozitifdir. Kondilomata aküminatalı %33,3 hastada HPV negatif, %66,7'sinde HPV pozitifdir. Vajinal Intraepitelial Neoplazi tanısı alan hasta bir tane olup, HPV sonucu negatif olarak tespit edilmiştir.

Tablo 1'de olguların yaş ortalamaları ve cinsel aktivite süreleri, oral kontraseptif, sigara kullanımı, ortalama doğum sayıları ve kadın hastalığı öyküsü ile HPV pozitiflikleri arasındaki ilişki verilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 1. HPV ile yaş, kadın hastalığı öyküsü, sigara kullanımı, oral kontraseptif kullanımı, cinsel aktivite süresi, parite sayısı arasındaki dağılım

		HPV(+)Ort±SS	HPV(-) Ort±SS	İstatistiksel Değer
Yaş		39,55±10,07	39,96±10,56	t=1,21p=0,69
Sigara kullanımı	Var	3 (%11,5)	23 (%88,5)	p*=0,368
	Yok	6 (%5,3)	108 (%94,7)	
Oral kontraseptif kullanımı	Kullandı	4 (%9,8)	37 (%90,2)	p*=0,448
	Kullanmadı	5 (%5,1)	94 (%94,9)	
Cinsel aktivite süresi		15,66±11,23	19,06± 11,46	t=0,86 p=0,999
Parite Sayısı	Doğum yapmamış	2 (%11,1)	16 (%88,9)	x2=0,76 p=0,341
	Bir doğum yapmış	1 (%6,3)	15(%93,8)	
	Birden fazla doğum	6 (%5,7)	100 (%94,3)	

t:Student t testi, χ^2 : Ki-kare testi, p*=fisher exact test

TARTIŞMA

Servikal kanser dünya üzerinde kadın popülasyonu açısından ikinci en yaygın kanser tipidir ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık ikinci nedenidir. Bütün kanser ölümlerinin yaklaşık %10'undan sorumludur (10). Günümüzde moleküler teknoloji destekli epidemiyolojik çalışmalar HPV enfeksiyonlarının servikal kanser gelişimindeki ana rolünü kanıtlamıştır (6, 11). En karsinogenik HPV genotipi HPV tip 16'dır ve bütün servikal kanserlerin %55-60'ından sorumludur. İkinci sırada HPV genotip 18 gelmektedir ve servikal kanserlerin %10-15'inden sorumludur (12).

Kolombiya merkezli Latin Amerikalı kadınlar arasında yapılan bir çalışmada, normal servikal sitolojiliye sahip kadınlarda HPV oranı %14,5 ile %16,6 oranında tespit edilmiştir (13).

Koyuncu (14) tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada normal sitoloji gösteren pap smearli kadınlarda HPV genotip dağılımı araştırılmış, %52,9 ile HPV genotip 16 birinci sırada bulunurken, HPV genotip 18 %29,14 ile ikinci sırada, daha sonra azalan sıklıklarla HPV genotip 52 ve 45 bildirilmiştir. Anormal sitolojili kadınlarda ise en sık HPV tipi olarak %52,9 ile HPV genotip 16 bulunmuş, sonra sırasıyla %22 ile HPV genotip 18, %11,8 ile HPV genotip 52 tespit edilmiştir.

Ergünay ve ark. (15) 2007 yılında yaptıkları karsinogenik riskli ve sınıflandırılmayan riskli genotiplerin sıklığı çalışmasında, HPV DNA tespit edilen hastaların 22'sinde (% 78,6) HPV 16, 18, 31, 45, 56, 59, olası risk taşıyan 2 hastada HPV genotip 53, (% 7,1) 4 hastada (%14,3) ise sınıflandırılmayan HPV 6, 54, 72, 81 genotipini tespit etmişlerdir.

ABD'de yapılan HPV prevalansının yaşlara göre değerlendirildiği bir çalışmada HPV prevalansı 14-19 yaş arası %24,5, 20-24 yaş arası %44,8, 25-29 yaş arası %27,4, 30-39 yaş arası %27,5, 40-49 yaş arası %25,2 ve 50-59 yaş arası %19,6 olarak bulunmuştur. Buna göre HPV prevalansının 20-24 yaş arasında en yüksek olduğu görülmektedir. Bu da cinsel aktivitenin en yoğun olduğu dönemle uyumlu olup 40 yaştan sonra belirgin bir şekilde azalmaktadır (16). Bizim çalışmamızda HPV DNA pozitifliğinin yaş ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

KAYNAKLAR

- Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine 2006; 24: 1-10.
- Trottier H, Burchell AN. Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. Public Health Genomics 2009; 12: 291-307.
- Murray R. Klinik Mikrobiyoloji Çeviri Editörü Ahmet Başustaoglu, Atlas Kitapçılık, Ankara 2009; 1601.
- Shaikh F, Sanahi P, Rawal R. Molecular screening of compounds to the predicted Protein-Protein Interaction site of Rb1-E7 with p53-E6 in HPV Bioinformation 2012 volume 8.
- Guzm'an-Olea E, Berm'udez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Torres-Poveda K, Madrid-Marina V. Molecular mechanism and potential targets for blocking HPV-Induced lesion development. J Oncol 2012; 2012: 278312.

Rotell-Martins ve ark. (17) Brezilya'da yaptıkları bir çalışmada karsinogenik riskli HPV tiplerinin prevalansının sigara kullananlarda kullanmayanlara göre belirgin derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır. Sigara ve HPV enfeksiyonu birlikteliğinin servikal intraepitelyal neoplazi gelişiminde, birbirlerinin etkilerini arttırdığı düşünülmektedir (18). Koyuncu (14) ve Eren (19) yaptıkları çalışmada oral kontraseptif kullanımı ile HPV enfeksiyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Diane ve ark.'nın (20) yaptıkları çalışmada da HPV ile oral kontraseptif kullanımı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda sigara kullanımı, oral kontraseptif kullanımı, cinsel ilişki süresi, kadın hastalığı öyküsü ve parite sayıları ile HPV pozitifliği arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Biyopsi sonuçlarına göre, kondiloma aküminatalı olgularımızda HPV DNA %2,1 (n=3) oranında pozitif bulunmuştur. HPVpozitif olarak tespit edilen hastaların birinde üç çeşit yüksek riskli HPV DNA (genotip 16, 56, 59) birlikte tespit edilirken diğer bir olguda düşük riskli HPV DNA genotip 6 tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda kondiloma aküminatanın daha çok Tip 6 ve 11 ile ilişkili olduğu gösterilmiş olup 42 olguluk bir derlemede, nüks oranı % 66, malign transformasyon oranı ise % 56 olarak bildirilmiştir (21).

Yaptığımız smear testinde yüksek grade squamöz intraepitelyal lezyon (HSIL) ve düşük grade squamöz intraepitelyal lezyon (LSIL) olgusu tespit edilmezken, ASCUS pozitif olgularda da HPV DNA pozitifliğine rastlanmamıştır.

Karsinogenik riskli genotiplerin sıklığının bilinmesi, kalıcı HPV enfeksiyonlarının saptanması ve çeşitli yöntemlerle HPV DNA'nın ve genotiplerinin belirlenmesi, servikal kanserlerin önlenmesinde, takip ve tedavilerinde oldukça önemlidir.

Sonuç olarak yöremizde tespit ettiğimiz HPV DNA pozitifliği ülkemiz verileri ile karşılaştırıldığında yüksek denilebilecek bir orandadır. Sitolojik takibin yanında moleküler testler de takipte oldukça önemlidir. Ayrıca belirlenen genotipler gelecekte ülkemizde de yapılması gereken rutin aşılama çalışmalarında kullanılacak genotiplerin önceliğini belirlemede yararlı olacaktır.

6. Mc Intyre P. Finding the viral link: the story of Harald zur Hausen Cancer World 2005; 32-37.
7. Kimple AJ, Torres AD, Yang RZ, Kimple RJ. HPV-Associated head and neck cancer: molecular and nano-scale markers for prognosis and therapeutic stratification. Sensors 2012; 12: 5159-69.
8. Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens Part B: biological agents. Lancet Oncol 2009; 10: 321-2.
9. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology 2004; 324: 17-27.
10. Rossi PG, Ricciardi A, Cohet C, et al. Epidemiology and costs of cervical cancer screening and cervical dysplasia in Italy. BMC Public Health 2009; 1186: 1471-2458-9-71.
11. Paola Massimi P, Banks L. Transformation assays for HPV oncoproteins. Methods Mol Med 2008; 119: 381-95.
12. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American cancer society, american society for colposcopy and cervical pathology, and american society for clinical pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. Am J Clin Pathol 2012; 137: 516-42.
13. Perez G, Lazcano-ponce E, Hernandez-Avila M, et al. Safety immunogenicity and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (type 6, 11, 16, 18) L1 virus-like particle vaccine in Latin American women. Int J Cancer 2008; 122: 1311-8.
14. Koyuncu E. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne başvuran hastaların servikal sitolojilerin servikal kanser risk faktörlerine göre analizi normal ve anormal sitolojik sonuçlarda yüksek onkojenik HPV prevalansı Uzmanlık Tezi. İstanbul 2006.
15. Ergunay K, Misirlioğlu M, Pinar F, Tuncer ZS, Tuncer S, Ustaçelebi S. Human papillomavirus DNA in cervical samples with cytological abnormalities and typing of the virus. Mikrobiyol Bül 2007; 41: 219-26.
16. Dunne EF, Unger ER, Stenberg M, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. JAMA 2007; 297: 813-9.
17. Rotell-Martins CM, Panetta K, Alves VA, Siqueira SA, Syjanen KJ, Derchain SF. Cigarette smoking and high risk HPV DNA as predisposing factors for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young Brazilian women. Acta Obstet Gynecol Scand 1998; 77: 678-82.
18. Polat H, Yarkın F, Vardar MA, Serin MS, Köksal F. Servikal kanserli kadınlarda Human papillomavirusu enfeksiyonları ve diğer risk faktörlerinin saptanması. İnfeksiyon Dergisi 1996; 10: 13-9.
19. Eren H. Serviksin prekanseröz lezyonlarındaki Humanpapillomavirus prevalansı. SB Göztepe Eğitim ve Araştırma hastanesi uzmanlık tezi 2007; P: 17.
20. Diane M, Harper MD, Meghan R, et al. Factors affecting the detection rate of human papillomavirus. Ann Fam Med 2003; 1: 221-7.
21. Chu QD, Vezeridis MP, Libbey, NP, Wanebo HJ. Giant condyloma acuminatum (Buschke-Lowenstein tumor) of the anorectal and perianal regions. Analysis of 42 cases. Dis Colon Rectum 1994; 37: 950-7.