

# HPV GENOTİPLENDİRMEDE KULLANILAN YÖNTEMLERDEN KAYNAKLANAN SORUNLAR VE TARTIŞMALAR

**Paşa GÖKTAŞ, Şafak GÖKTAŞ, Nilay MALKOÇ**

**Gelişim Tıp Laboratuvarları Moleküler Mikrobiyoloji Ünitesi,  
Kızıltoprak, İSTANBUL**

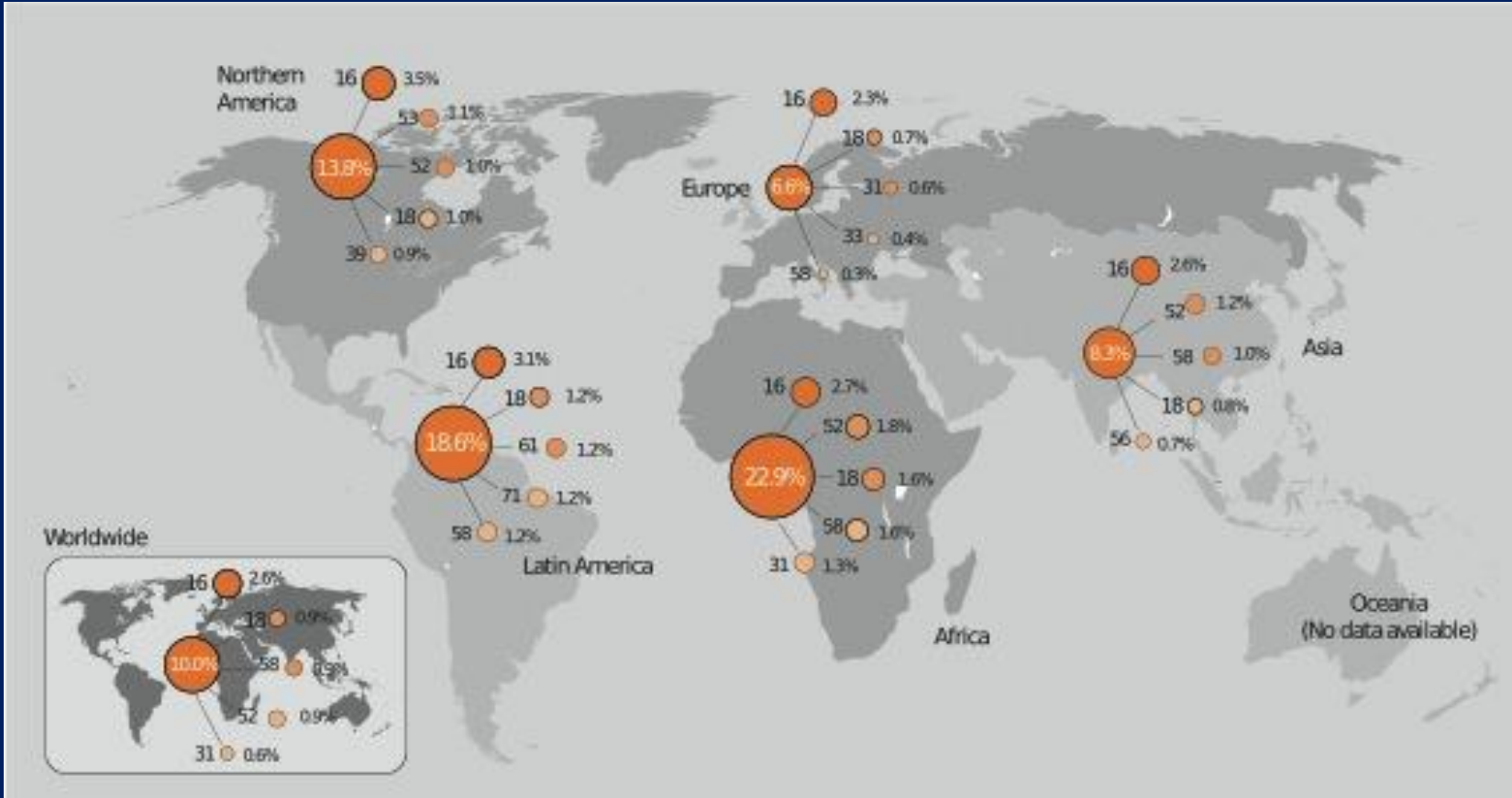
# AMAÇ

- Hekimler ve hastalar arasında en çok tartışma ve polemik konularından birisi olan HPV genotiplendirme ile ilgili tartışmalara katkı sunabilmektir.

# HUMAN PAPILLOMA VIRUS

- HPV 200'den fazla deęişik tipi olan Papovavirus ailesine üyedir.
- **120'den fazla değişik HPV tipi saptanmıştır.**
- **40'dan fazla HPV tipi cinsel yolla bulaşır.**
- **Cinsel olarak aktif erkeklerin %90'ı, kadınların %80'i hayatboyu en az 1 HPV ile enfekte olurlar.**
- Bu infeksiyonların yarısı yüksek riskli HPV'dir.
- Çoğu HPV infeksiyonu (yüksek riskliler dahil) belirti göstermez, 1-2 yıl vücutta kalabilir ve kaybolur.

# HPV Prevalansı



Meta analiz: 36 ülke, 157879 normal sitolojiye sahip kadın

# HPV ve KANSER

- **HPV tüm kanser vakalarının %5'inden sorumludur.**
  - **Servikal kanser:** Neredeyse tamamı HPV kaynaklıdır.
  - **Anal kanser:** >%95' i HPV tip16 kaynaklıdır.
  - **Oropharyngeal kanser:** >%70'i HPV kaynaklıdır. Yarısı HPV tip16.
  - **Nadir kanserler:** Vajinal kanserin %65'i, vulvar kanserin %50'si ve penile kanserin %35'i HPV kaynaklıdır. En yaygın HPV tip16.

# HPV ve KANSER

- HPV tip 9 ve 11: Genital ve anal bölgede görülen condylomata acuminata'nın >%90' dan sorumludur.
- HPV tip 16 ve 18: HPV kaynaklı Kanserin >%70'den fazlasından sorumludur.

# HPV Tiplerinin Sınıflandırılması

Sınıflandırma	HPV tipleri
Grup 1 Yüksek risk	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Grup 2A Olası kanserojenik (yüksek risk)	68
Grup 2B Olası kanserojenik (intermediate risk)	26, 53, 66 <sup>a</sup> , 67, 70, 73, 82
Grup 2B Bilinmeyen risk <sup>b</sup>	30, (34), 69, (85), 86, (97)
Grup 3 Düşük risk	6, 11, 40, 42, 43, (44), 54, 61, (71), (72), 81, 89, 90 <sup>c</sup>
Not : IARC 2012'de belirtilen ancak bilinmeyen ya da düşük risk olarak sınıflandırılan	HPV 74, 83, 87, 91

(a) IARC 2007'de kanserojenik (yüksek risk)

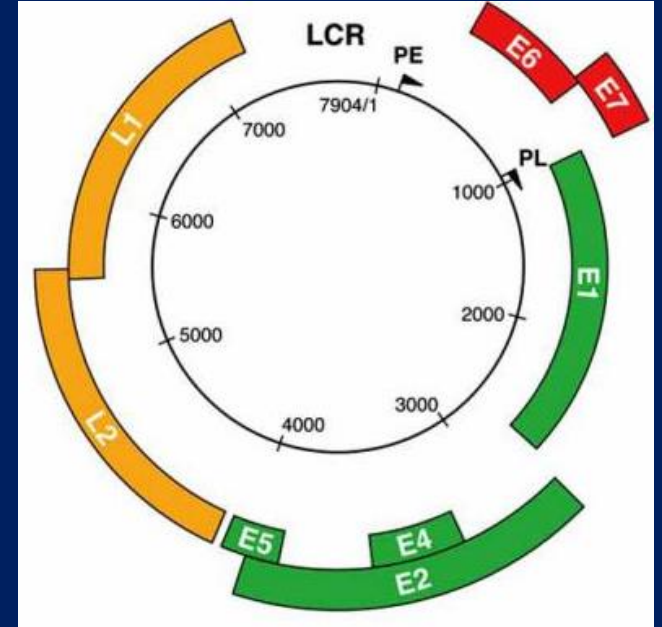
(b) Filogenetik bilgilere göre

(c) IARC 2012'de belirtilmemiş

(IARC: International Agency for Research on Cancer)

# HPV GENOMU ve TIPLENDİRME

- Genom: 8kb halkasal DNA
- 6 early protein (E1-E7)
  - HPV replikasyonu
  - p53 yıkımı ve Rb inaktivasyonu
  - EGFR ve PI3/Akt yolak aktivasyonu
- 2 late protein (L1-L2)
  - Viral capsid proteinleri
- Genomdaki varyasyonlar incelenerek HPV tiplendirme yapılmakta ancak analiz edilen tüm bölgeler her HPV tipini ayırt edememektedir.
- En sık kullanılan MY09/11 ve Gp5/6 primerleri L1-L2 bölgesine bağlanmaktadır.





# GELİŞİM TIP LABORATUVARLARI ve HPV

## YÖNTEM:

### HPV Genotipleme için yapılan örnek çalışma

- Laboratuvarımızda HPV genotipleme için 3 ayrı yöntem kullanılmaktadır;
  - **f HPV typing™ fragman Kiti**
  - **HPV-QUANT-21® Kantitatif Real Time PCR kiti**
  - **DNA Dizi analizi**
- 2016 Kasım ayında, HPV genotiplendirme istemiyle gönderilen rastgele 110 örnek seçilmiştir
  - **HPV pozitifliği kıyaslaması**
  - **HPV genotipleme kıyaslaması yapılmıştır.**

## YÖNTEM:

# Kullanılan Genotiplleme Kitleri

### ■ **f HPV typing™ fragman Kiti:**

- HPV genomu E6 –E7 bölgesine bağlanan florasanlı primerlerle yapılan multipleks PCR ürünleri ABI fragman analizi ile değerlendirilmekte.
- **16 HPV tipi:** HPV tip 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ve 68.

### ■ **DNA dizi analizi:**

- HPV genomu L1-L2 bölgesine bağlanan primerlerle yapılan PCR ürünleri ABI DNA dizi analizi ile değerlendirilmekte.
- Teorik olarak **TÜM HPV tiplerini** kapsamaktadır.

### ■ **HPV-QUANT-21® Kantitatif Real Time PCR kiti:**

- Kantitatif sonuç vermekte.
- **21 HPV tipi:** HPV tip 6, 11, 44, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82.

## YÖNTEM:

# ANALİZ ŞEMASI

**110 Örnek\***

Real Time PCR tarama  
(L1-L2 genom bölgesi)

Pozitif : 61 (%55.5)  
Negatif : 49 (%44.5)

HPV-QUANT-21® Kantitatif  
Real Time PCR kiti

Pozitif : 54 (%49) (**GENOTİP SAPTANDI**)  
Negatif : 56 (%51) (**GENOTİP NEGATİF**)

**15 pozitif Örnek**

DNA dizi Analizi

f HPV typing™

HPV-QUANT-21®

\*:2016 Kasım ayında, HPV genotiplendirme istemiyle gönderilen rastgele 110 örnek seçilmiştir

# BULGULAR-1

	<u>Negatif</u>	<u>Pozitif</u>
■ Real-Time PCR Tarama	49 (%44.5)	61 (%55.5)
HPV-QUANT-21®	56 (%51)	54 (%49)
■ Real-Time PCR Negatif 49 örnek, HPV-QUANT-21® ile de Negatif bulundu.		
■ 14 örnek Real-Time PCR ile Pozitif, HPV-QUANT-21® ile Negatif bulundu.		
■ <b>Tüm tipleri yakalamada</b> Real- Time PCR tarama %100 kabul edilirse,		
HPV-QUANT-21®:	<b>%87.3 Duyarlı (tüm HPV tipler)</b>	
	<b>%97.0 Duyarlı (yüksek riskli HPV tipleri)</b>	

# BULGULAR-2

- **15 HPV POZİTİF örnek için GENOTİPLEME;**
- **DNA Dizi Analizi** : 12 örnekte yüksek risk – 3 örnekte düşük risk HPV
- DNA dizi analizi referans yöntem olarak kabul edilirse;

- **HPV-QUANT-21<sup>®</sup>**: %93.3 Duyarlı (tüm HPV tipleri)  
%100 Duyarlı (yüksek riskli HPV tipleri)

(Yüksek risklerde 12’de 12, düşük risklerde 3’te 2 tespit)

- **f HPV typing<sup>™</sup>** : %86.7 Duyarlı (tüm HPV tipleri)  
%91.6 Duyarlı (yüksek riskli HPV tipleri)

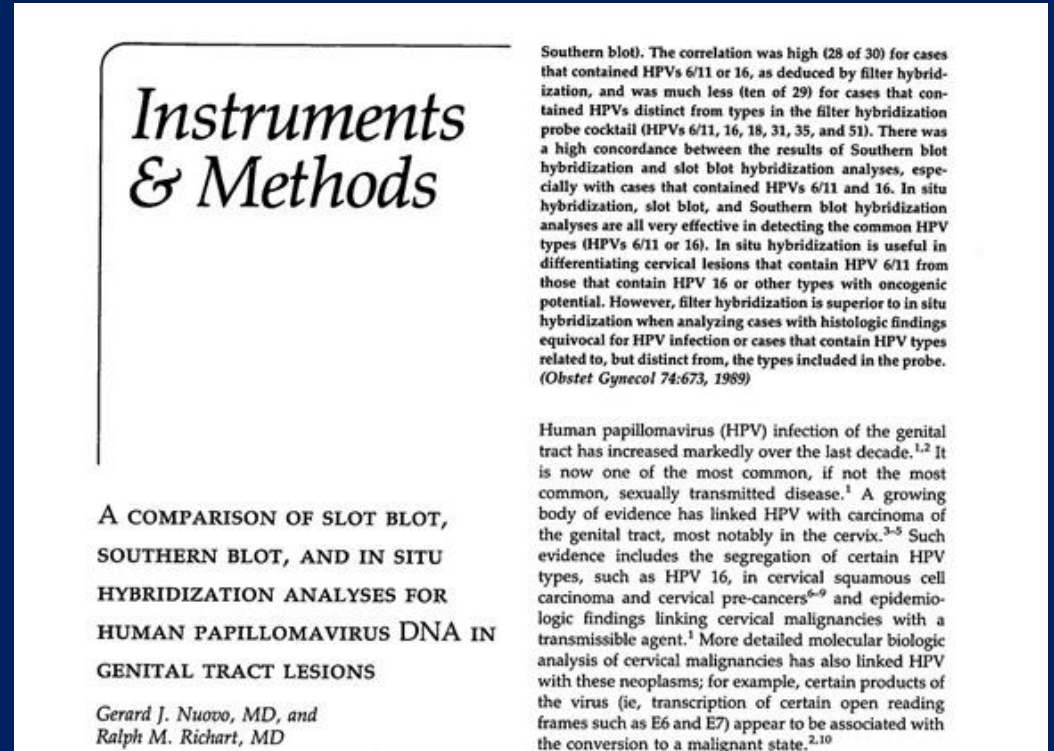
(Yüksek risklerde 12’de 11, düşük risklerde 3’te 2 tespit)

# HPV ve Yöntem Uyumsuzlukları

- Pubmed'de >400 den fazla yayın HPV tayin ve genotiplemedeki yöntem farklılıklarını incelemiştir.

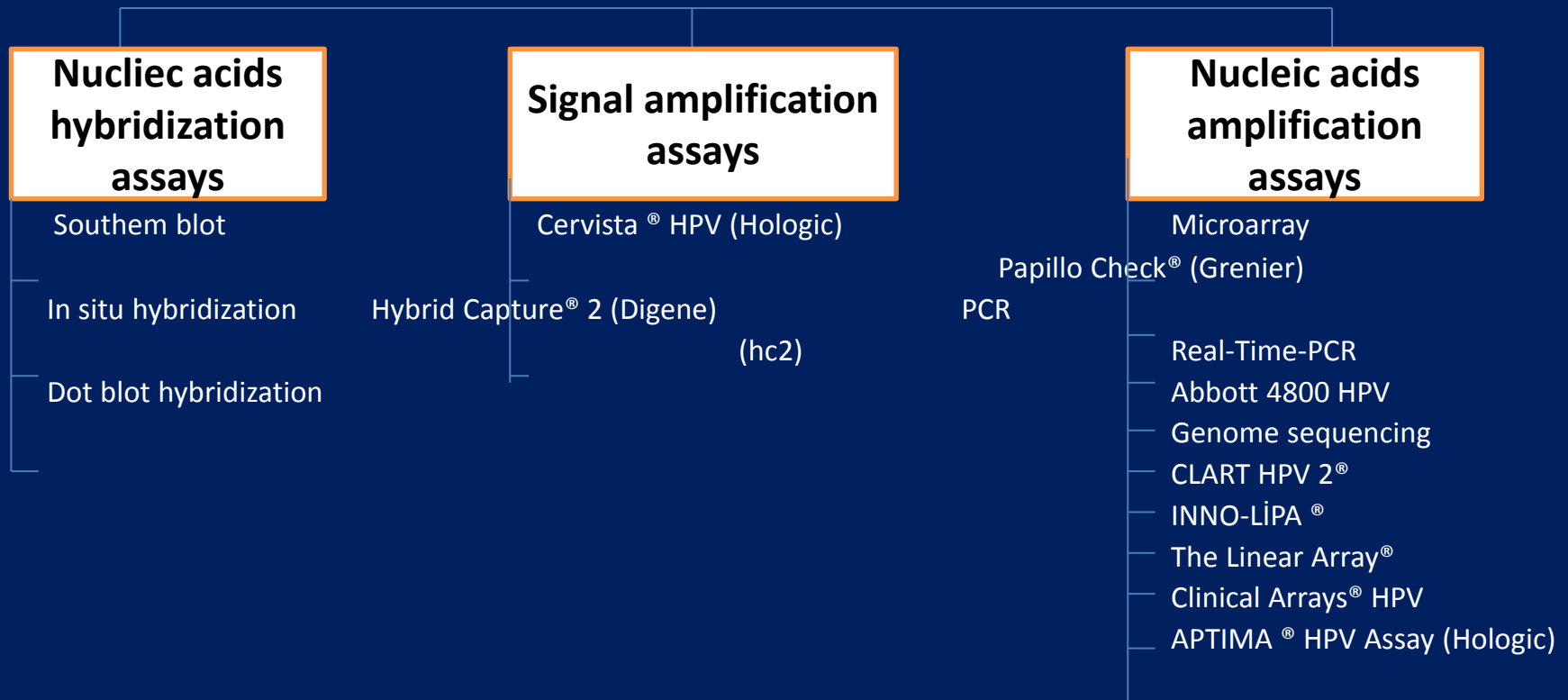
- ilk yayın 1989 yılında;  
In situ hibridizasyon yönteminin  
Slot blot ve souther blot'tan daha  
iyi olduğu rapor edilmiş.

- Günümüzde;  
PCR yöntemi Gold-standart



# HPV Tanı Yöntemleri

## Classification to HPV tests





# NÜKLEİK ASİT HİBRİDİZASYON TESTLERİ

Belirli sayıda üretici bulunmaktadır.

INNO-LİPA HPV (Fujirebio): 14 HPV tipini saptıyor. Ancak içinde yüksek risklerden 35,39,52,66 bulunmuyor.

**Avantajı:** Düşük volümlü ve sınırlı teknolojiye sahip laboratuvarlarda da yapılabilmesi

**Dezavantajı:** Sensitivite düşük

Tüm yüksek riskleri kapsamıyor

Prosedür zaman alıcı ve oyalayıcı

Büyük miktarda saf DNA gerekiyor

# SİNYAL AMPLİFİKASYON TESTLERİ

**Avantajı:** Kantitatif sonuç da alınabilmesi

FDA onaylı test var

Yanlış pozitiflik oranı düşük

Genotip ayırımında duyarlılık yüksek

**Dezavantajı:** Lisanslı ve patentli teknolojiler

Fazla üretici yok

Bu nedenle maliyet yüksek

# SİNYAL AMPLİFİKASYON TESTLERİ

## Hybrid Capture® 2 HPV (Digene): İlk FDA onaylı kit (2003)

13 yüksek riskli tipi ayırt edebiliyor

Birden fazla tip pozitif ise, ayırım yapamıyor

Tek onkojenik tiplerin belirlenmesi önemli

Çünkü Tip-16 ve Tip-18'in prekanseröz lezyon oluşturma riski %10-15, diğer tipler için %3 denilmekte

Bazı çalışmalarda, HPV 16 ve 18'in servikal Ca'lerin %70'inden sorumlu olduğu belirtilmekte

# SİNYAL AMPLİFİKASYON TESTLERİ

## Cervista HPV (Hologic)

FDA onaylıdır (2011)

14 yüksek tipi saptıyor

Servikste orta derece displaziyi gösteren CIN2 lezyonlarda duyarlılığı %98, CIN3 lezyonlarda %100'dür

# NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ

- PCR
  - Real-Time PCR
  - Microarray
  - Genome sequencing (Sekans analizi)
- Çoğu test bu yöntemlerle yapılmaktadır

# NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ

---

## **Avantajları:**

- Fleksibl teknoloji
- Çok yüksek sensitivite

## **Dezavantajları:**

- Bazı genotiplerde zayıf sinyal alınması
- Kontaminasyon nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar alınabilmesi

# PCR Tekniđi

- Düşük kopya sayısı bulunan örneklerde çoklu tip pozitif ise, yanlış negatif sonuçlar olabilmekte
- Tüm HPV genotipleri saptanamayabilir
- Birden fazla HPV genotipi içeren örneklerde birden fazla amplifikasyon oluşabilir ve tip ayrımı zorlaşabilir

# Real- Time PCR Tekniđi

Piyasada kullanılan çoğu test bu gruptadır.

## Roche COBAS® 4800 HPV:

FDA onaylıdır (2011)

14 yüksek riski tarama şeklinde saptıyor

Tip 16 ve 18'i ayrı ayrı saptıyor

**Bir genotipleme kiti değildir, tarama kitidir**

Tip 16 ve 18 için genotipleme yapmaktadır

Diğer tiplerden biri pozitif ise, test sonucunu POZİTİF olarak vermektedir, ancak tip belirtememektedir

CIN 2 lezyonları için klinik **sensitivitesi %90, spesifitesi ise %70'tir**



# Real- Time PCR Tekniđi

## Aptima HPV Assay (Hologic):

FDA onaylıdır (2011)

14 yüksek riski saptamaktadır

Ancak tipler arasında ayırım yapamamaktadır

**Bir genotiplendirme kiti değildir, tarama kitidir**

Farklılığı, onkojenik potansiyeli gösteren E6 ve E7 mRNA genlerini de saptaması ve FDA onayı almasıdır

# Real- Time PCR Tekniđi

## Abbott Real-Time HPV Assay:

FDA onayı yoktur

14 HPV tipini taramakta,

Tip 16 ve 18'i ayrı ayrı saptamaktadır

**Bir genotiplendirme kiti değildir,  
tarama kitidir**

# Microarray Testleri

Duyarlılığı değişmektedir

Üreticilere göre saptadığı tip sayısı değişmektedir

Saptanan tip sayısı 36'ya kadar çıkabilmektedir

Dezavantajı, belirli sayıda testi biriktirerek topluca çalışma zorunluluğudur

Özel Microarray okuma platformu gerekmektedir

Maliyet yüksek seyretmektedir

# Microarray Testlere Örnekler

**Roche Linear Array<sup>®</sup>**: 36 HPV tipini belirliyor

**Clinical Arrays<sup>®</sup> HPV (Genomica)**: 35 HPV tipini belirliyor

**CLART<sup>®</sup> HPV-2 (Genomica)**: 35 HPV tipini belirliyor

**HPV 9G DNA Chip (Biometrix, Kore)**: 19 HPV tipini belirliyor (14 yüksek risk, 5 düşük risk)

# Karşılaştırmalı Çalışmalar

356 servikal sürüntü örneğinde:

- Roche Cobas HPV,
- Abbott Real-Time HPV,
- Digene Hybrid Capture 2 HPV (Signal amplification)

**Referans yöntem olarak Dizi Analizi (Genome sequencing) kabul edilmiş**

Üç yöntemin birbiriyle uyum oranı %82.6

Abbott RT ve Roche COBAS HPV uyum oranı %89.6

Abbott RT HPV'nin HC 2 ile uyumu %86.1

Roche Cobas HPV'nin HC2 ile uyumu %89.6'dır

# Referans Yöntem Olarak Kabul Edilen Sekans Analizine Göre Oranlar

Yöntem	Sensitivite	Spesifite
Hybrid Capture 2 (Digene)	%96.6	%89.1
Roche Cobas HPV	%91.7	%97.0
Abott RealTime PCR	%78.3	%99.2

# Karşılaştırmalı Çalışmalar

**214 Servikal Sürüntü Örneğinde:**

**Roche Cobas HPV ile Biometrix HPV 9G DNA  
Microarray testleri karşılaştırılmış**

İki yöntem arasında uyum %81.7

HPV 16 ve 18'i saptayabilme oranı % 97.2

Yüksek riskli genotiplerde sensitivite iki yöntemde  
de %100 bulunmuş

# En İyi Yöntem Hangisidir?

FDA'in yayınladığı makaleye göre:

**Gold standart yöntem DNA dizi analizi (Genome sequencing) olarak belirtiliyor**

Çünkü sekans analizi:

**Tüm HPV tiplerini tanımlayabilen ve örnekteki tüm varyantları gösterebilen tek yöntemdir.**

Dezavantajı, pahalı ekipmanlar gerektirmesi, deneyimli personele sahip olma sorunluluğu ve yoğun uğraş gerektiren bir yöntem olmasıdır.

Bu nedenle de, çok az laboratuvar bu yöntemi kullanabilmektedir.



# SONUÇ:

---

- Yöntemler arasında tam bir uyum yakalamak oldukça zordur
- Bazı Real-Time PCR kitleri tüm HPV tiplerini taramaktadırlar
- Sekans analizi ile tüm HPV tiplerini taramak ve tiplendirmek mümkündür

# SONUÇ:

- Çeşitli firmalara ait ticari kitler ise, yalnızca belirli tipleri taramaktadırlar
- Çoğunlukla da yüksek tipleri taramaktadırlar
- Bu fark nedeniyle, **POZİTİF'lik** ve **NEGATİF'lik** oranları değişmektedir

# Kabul Edilebilir Bir HPV Tarama Kiti Nasıl Olmalıdır?

En azından 14 yüksek riskli tipi tarayabilir özellikte olmalıdır

## **Daha Fazla Tercih Edilebilir Bir HPV Tarama Kiti:**

14 tip dışındaki diğer muhtemel yüksek riskli tipleri ve ayrıca, olabildiğince düşük riskleri de tarayabilir özellikte olmalıdır

## **Kabul Edilebilir Bir HPV Genotiplendirme Kiti:**

En azından HPV Tip 16 ve Tip 18'i ayrı ayrı belirleyen özellikte olmalıdır

## **Daha Fazla Tercih Edilebilir Bir HPV Genotiplendirme Kiti:**

14 yüksek risk dışında, muhtemel yüksek riskleri ve bir kısım düşük riskleri de ayrı ayrı belirleyebilir özellikte olmalıdır

# Biz Nasıl Bir Yol İzliyoruz?

- İlk adım olarak tüm tipleri tarayan Real-Time PCR aşamasını kullanıyoruz
- Pozitif bulunan örnekleri:
  - **Kantitatif genotiplendirme sonucu** isteniyorsa, DNA Technology'nin 18 yüksek risk, 3 düşük risk olmak üzere toplam 21 tipi ayrı ayrı ve kantitatif olarak belirleyen Real-Time PCR genotiplendirme çalışmasına alıyoruz
  - **Tüm tipler kalitatif genotiplendirme olarak isteniyorsa**, ABI sekans analizörü ile sekans çalışmasına alarak tiplendirme yapıyoruz.