

Genital İnsan Papillomavirus Enfeksiyonlarının Moleküler Tanısında Karşılaşılan Sorunlar ve Yeni Gelişmeler

Current Problems and Recent Advances in the Molecular Diagnosis of Genital Human Papillomavirus Infections

Fatih ŞAHİNER¹

¹ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Gulhane Military Medical Academy, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 19.04.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 04.07.2014

ÖZET

Moleküler tanı yöntemlerindeki gelişmelerin bir sonucu olarak, 1980'li yılların başlarında servikal kanser (SK) biyopsileri ve SK hücre kültürlerinin insan papillomavirus (HPV) DNA dizilerini içerdiği gösterilmiştir. Sonraki yıllarda, HPV E6 ve E7 genlerinin SK dokularında eksprese edildiği ve bu onkoproteinlerin pRb ve p53 başta olmak üzere çeşitli hücre proteinleriyle etkileşim içinde olduğu keşfedilmiştir. Serviks kanseri ile HPV enfeksiyonları arasındaki ilişkinin gösterilmesi bu konuya olan ilginin artmasına neden olmuş ve yapılan geniş ölçekli epidemiyolojik çalışmalarda bazı HPV tiplerinin SK için majör risk faktörü olduğu belirlenmiştir. Yüksek riskli veya onkojenik tipler olarak adlandırılan bu tiplerin diğer anogenital kanserler ve baş-boyun kanserlerinin bir alt grubu ile de ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu süreçte her biri farklı yaklaşım ve uygulamaları içeren çok sayıda ticari ve kullanıcı tasarımı (in-house) tanı yöntemi geliştirilmiş ve HPV-DNA tespitine dayalı testler SK tarama programlarının önemli bir parçası haline gelmiştir. HPV enfeksiyonlarının tanı ve takibinde (yönetiminde) kullanılan tarama-iplendirme yöntemlerinin ve kombine yaklaşımların her birinin kendilerine özgü güçlü ve zayıf yönleri mevcuttur. Yöntem seçimini kritik ve karmaşık hale getiren, gerek metodoloji gerekse virusun doğasından kaynaklanan çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Çok sayıda farklı HPV tipinin genital bölgede enfeksiyon etkeni olarak saptanabilmesi, viral genomun aynı HPV tipi içinde bile çok sayıda dizi varyasyonları gösterebilmesi, mevcut yöntemlerin saptama duyarlılığının HPV tiplerine ve incelenen örnekte bulunan viral DNA kopya sayılarına bağlı olarak değişebilmesi ve son olarak çoklu enfeksiyonları saptama ve tip tayini yapabilme yeteneğinin yöntemler arasında farklılıklar göstermesi bu zorluklardan bazılarıdır. Bu derleme yazıda, HPV enfeksiyonlarının tanı ve takibi için kullanılan yöntemlerin özetlenmesi ve yöntem seçiminde yol gösterebileceği düşünülen güncel bilgilerin paylaşılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, geçmiş yıllarda kullanılan moleküler temelli HPV testleri ve bu testlerin gelişim sürecine kısaca değinilmiş, günümüzde kabul gören ve yaygın olarak kullanılan tanı, tarama ve iplendirme yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

Anahtar sözcükler: İnsan papilloma virusu; HPV; moleküler tanı; genotiplendirme; tarama testi; genital enfeksiyon.

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Fatih Şahiner, GATA Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, 06018, Etlik, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 304 3481, **E-posta (E-mail):** fsvirol@gmail.com

ABSTRACT

It was proven in the early 1980s that cervical cancer (CC) biopsy specimens and CC cell lines contain human papillomavirus (HPV) DNA sequences. In subsequent years, researchers discovered that the E6 and E7 genes of HPV are expressed in CC tissues and these oncoproteins interact with cellular proteins, including pRb and p53. Establishment of the relationship between HPV infections and CC led to increasing interest on this topic. Comprehensive epidemiological studies determined that specific types of HPV are major risk factors for CC. These HPV types, called high-risk or oncogenic types, are associated with other anogenital cancers and a subset of head and neck cancers. A number of commercial and in-house diagnostic techniques, each of which has a different approach and methodology, have been developed to diagnose HPV infections. HPV testing based on the detection of viral DNA has become an important part of CC screening programs. These screening-typing methods and combined approaches, which are used to diagnose and follow-up (management) HPV infections, have advantages and disadvantages. The choice of method is complicated by several factors and challenges that arise owing to the nature of the virus and the assay methodology. For example, a number of different HPV types can cause genital infections, multiple sequence variations are often observed even in the same HPV genotype, the detection sensitivity of the available methods is variable depending on the HPV genotypes and the viral DNA copy number in the samples examined. The capability for the detection of multiple infections and the ability to perform genotyping differ between the methods. The aim of this review is to summarize the methods used for the diagnosis and follow-up of HPV infections, and to share the current informations that may be helpful for the choice of appropriate method. For this purpose, molecular-based HPV tests that were used in the past and their development processes were described briefly, then currently accepted and widely used methods for diagnosis, screening, and typing were discussed in detail, along with their advantages and disadvantages.

Key words: Human papillomavirus; HPV; molecular diagnosis; genotyping; screening test; genital infection.

GİRİŞ

İnsan papillomavirusları (HPV), epitelyal dokulara tropizm gösteren, ikozahedral kapsidli, 52-55 nm büyüklüğünde küçük zarfsız viruslardır¹. HPV tipleri genel olarak mukozal veya kütanöz tipler şeklinde sınıflandırılırken, mukozaları enfekte eden HPV tipleri servikal kanserle etiyolojik ilişkilerine göre daha ileri düzeyde onkogenik veya yüksek riskli (high risk, HR), muhtemel yüksek riskli (PrHR) ve düşük riskli (low risk, LR) tipler olarak sınıflandırılmaktadır. LR-HPV tipleri siğil ve kondilom gibi benign lezyonlara yol açarken, HR tipler serviks kanseri başta olmak üzere çeşitli kanseröz lezyonlara neden olabilir^{2,3}.

Yaklaşık 8.0 kilobaz (kb) büyüklüğündeki HPV genomu, çift sarmallı çembersel DNA'dan oluşur ve üç temel bölge içerir. Birinci bölge; DNA replikasyonu, transkripsiyonel düzenlenmeler ve hücrel transformasyonla ilişkili erken proteinleri (E1, E2, E4, E5, E6 ve E7) kodlar ve yaklaşık 4.0 kb büyüklüğündedir. Virus partikülünün yapısal proteinleri olan geç proteinleri (L1, L2) kodlayan ikinci bölge yaklaşık 3.0 kb, kodlanmayan üçüncü bölge ise 0.9 kb büyüklüğündedir¹. Bahsedilen gen bölgelerinde yer alan bazı özel diziler (korunmuş gen bölgeleri veya tipler arası yüksek varyasyon gösteren bölgeler) makalenin ilerleyen bölümlerinde değinilecek olan farklı yöntemler için tanısal hedef olarak seçilmektedir.

Dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen ikinci kanser olan servikal kanserin tarama testleriyle önlenabilir olması, başlıca servikal yayma (smear) örneklerinin sitopatolojik incelemeleri ve HPV-DNA testlerinden oluşan tanı-tarama testlerinin önemini artırmıştır. Buna paralel olarak birçok ticari ve kullanıcı tasarımı (in-house) test geliştirilmiş ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA, Food and Drug Administration), bazı ticari testlerin HPV enfeksiyonlarında yardımcı tanı-tarama testi olarak ve belirli tipler için genotiplendirme amacıyla kullanılabileceğini onaylamıştır⁴. HPV-DNA testleri genel olarak yayma incelemelerine göre daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Bununla beraber, HPV enfeksiyonlarının büyük çoğunluğunun geçici olması nedeniyle, HPV-DNA testlerinin doğrudan tarama testi olarak kullanılması durumunda, takipler sırasında hasta üzerinde olumsuz psikolojik etkilerin ortaya çıkabileceği ve hastanın gereksiz kolposkopi uygulamaları ve invazif girişimlere maruz kalabileceği dikkate alınmalıdır. Bu ve benzeri olumsuz neticeleri en aza indirmek ve tarama stratejisinin klinik etkinliğini artırabilmek için servikal kanser taramalarının belirlenmiş programlar dahilinde düzenli olarak yapılmasını öngören, Pap yayması ve HPV-DNA testlerinin beraber kullanılmasına dayalı çeşitli tarama algoritmaları geliştirilmiştir³. Bu makalede ise ağırlıklı olarak HPV enfeksiyonlarının moleküler tanısında kullanılan tanı ve tiplendirme yöntemlerinin analitik etkinlikleri üzerinde durulacaktır.

HPV enfeksiyonlarının tanı ve takibinde (yönetiminde) kullanılan tarama-tiplendirme yöntemlerinin ve kombine yaklaşımların seçimini kritik ve karmaşık hale getiren, gerek yöntemsel gerekse virusun doğasından kaynaklanan çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Bunların en önemlileri; (a) çok sayıda farklı HPV tipinin (> 40) anogenital bölgede enfeksiyon etkeni olarak saptanabilmesi⁵, (b) genomun aynı HPV tipi içinde bile çok sayıda dizi varyasyonları gösterebilmesi⁶, (c) mevcut yöntemlerin saptama duyarlılıklarının test edilecek örnekteki virus kopya sayısı veya enfeksiyon etkeni tiplere göre değişebilmesi⁷⁻⁹, (d) HPV enfeksiyonlarında klinik seyrin etken HPV tiplerine göre önemli derecede değişkenlik göstermesi², (e) tanı yöntemlerinin kanseröz dönüşüm riskini öngörme, tekrarlayan-persistan enfeksiyonları belirleme ve prekanseröz lezyonların tedavi sonrası takibinde kritik önemi olan tip düzeyinde tanımlama yapabilme ve çoklu enfeksiyonları saptayabilme kabiliyetlerinin farklılığı^{8,10,11}, (f) yöntemlerin maliyetleri arasında belirgin farklılıkların olması ve (g) insan genomuna entegre olabilen tiplerde entegrasyon sırasında hedef genom bütünlüğünün bozulabilmesi olarak özetlenebilir.

Moleküler tanı yöntemlerindeki gelişmelere paralel olarak, yukarıda bahsedilen sorunların üstesinden gelebilmek için birçok teknik geliştirilmiş ve farklı yaklaşımlar denenmiştir. Bir klinik örnekte çok sayıda farklı HPV tipinin varlığını saptayabilecek şekilde tasarlanan konsensus polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sistemleri, iş gücü ve maliyetin azaltılmasını hedefleyen multipleks testler, HPV tiplerinin genotip düzeyinde saptanabilmesine imkan veren tipe özgül PCR testleri, özellikle yüksek riskli tiplerin varlığını saptayacak şekilde tasarlanan prob kokteyllerinin kullanıldığı sinyal amplifikasyon testleri, PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve HPV genotiplerinin tanımlanması için geliştirilen hibridizasyon temelli yöntemler ve bahsi geçen test ve yöntemlerin farklı kombinasyonlarını içeren çeşitli yaklaşımlar HPV enfeksiyonlarının tanısında geçerliliği olan ve

günümüzde yaygın olarak kullanılan moleküler testlerdir^{5,7,9,10,12-21}. Bu yöntemlerin her birinin kendilerine özgü güçlü ve zayıf yönleri bulunmaktadır. Bu derleme yazının amacı, HPV enfeksiyonlarının tanısında geçmişte kullanılmış olan yöntemlerin kısa bir özetini sunmak ve günümüzde yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemlerin çeşitli avantaj ve dezavantajlarını ele alarak, HPV enfeksiyonlarının tanı ve takibinde kritik öneme sahip olduğu düşünülen yöntem seçiminin önemine dikkat çekmektir.

HPV ENFEKSİYONLARININ TANISI

Klinik hastalık evresine ilerlemiş HPV enfeksiyonlarının tanısı, mevcut lezyonların görsel muayene ile değerlendirilmesi veya enfeksiyona ait belirtilerin varlığıyla konulabilirken, subklinik HPV enfeksiyonları Pap yayması incelemeleriyle veya rutin muayeneler sırasında tespit edilebilmektedir. Morfolojik, sitolojik ve kolposkopik inceleme sonuçlarının negatif olduğu latent asemptomatik HPV enfeksiyonlarının tanısı ise, ancak enfeksiyon bölgesindeki doku veya hücrelerde viral nükleik asitlerin gösterilmesiyle konulabilmektedir³.

Patolojik Tanı

Tanıda kullanılan sitopatolojik yöntemler, özgül ve özgül olmayan testler olmak üzere iki gruba ayrılır. Yayma ve biyopsi örneklerinin patolojik incelemeleri sık başvurulanan özgül olmayan tanı yöntemleridir. Konvansiyonel sitolojinin serviks kanserini saptama duyarlılığı %70-80 aralığında iken, yeni geliştirilen sıvı bazlı teknolojilerle bu oran %85-95'lere yükselmiştir³. Özgün problemlerin kullanıldığı moleküler temelli bir yöntem olan in-situ hibridizasyon özgül tanı yöntemlerine örnek olarak verilebilir. Hücre içi HPV-DNA ile hibridize olan problemlerin kullanıldığı bu yöntem, sitopatolojik incelemeleri tamamlayıcı niteliktedir; ancak özel amaçlar dışında yaygın kullanımı yoktur. Birden fazla tipe özgül probun kullanılmasını gerektiren bu yöntem düşük duyarlılığa sahip olmasına rağmen, enfeksiyonun lokalizasyonunu belirleyebildiği için özel bir öneme sahiptir¹⁷. HR-HPV enfeksiyonlarında, p53 ve retinoblastoma (pRb) proteinlerinin inaktive olmasıyla ekspresyonu artan p16 protein düzeylerinin immünohistokimyasal yolla ölçümünün de tanı ve klinik değerlendirmeler için faydalı olabileceği bildirilmiştir²².

Mikrobiyolojik Tanı

Enfeksiyöz HPV partikülleri standart in vitro kültür sistemlerinde üretilemezken, sadece ksenograft veya organotipik raft kültürleri gibi özel ortamlarda üretilabilmektedir. Ancak uygulaması zor olan bu yaklaşımlar, rutin virolojik tanıdan ziyade başlıca aşı geliştirme programları ve araştırma amaçlı kullanılmaktadır²³. Teknolojinin evrimi ile virus benzeri partiküllerin üretilmesi HPV enfeksiyonlarını tespit etmek için HPV L1 kapsid proteinine karşı oluşan antikorların kümülatif olarak ölçülebildiği serolojik testlerin geliştirilmesine öncülük etmiştir^{8,17}. Hatta, yeni geliştirilen yöntemler ile belirli HPV tiplerine karşı oluşan tipe özgül antikor yanıtları da ölçülebilmektedir. Enfeksiyonun geçirilmesinden uzun süre sonra bile (HPV-DNA varlığı saptanamadığı halde) antikor varlığının saptanabilir düzeyde olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber, HPV enfeksiyonlarının sistematik yayılımdan ziyade epitelyal doku ile sınırlı olması nedeniyle, HPV-DNA pozitif kadınların önemli bir bölümünde (%30-50) serokonversiyon oluşmayabilir. Ayrıca, bazı hastalarda

E6 ve E7 onkoproteinlerini eksprese ettikleri halde serolojik yanıt gelişmeyebildiği, ya da aksine herhangi bir malign enfeksiyon söz konusu olmadığı halde belirli tiplerle oluşan cilt enfeksiyonlarında antikor varlığı saptanabilmektedir. Serolojik yöntemlerin aktif ve geçirilmiş enfeksiyonları ayırt edememeleri sebebiyle, enfeksiyon tamamen temizlendiği halde antikor testlerinin pozitif olması da bir diğer problemidir. Tüm bu bahsedilen nedenler, serolojik testlerin HPV enfeksiyonlarının tanısında kullanılmasına veya hastalık ilerlemesi için bir prediktif belirteç olarak değerlendirilmesine engel olmaktadır^{8,17,24}. Sonuç olarak virusun rutin hücre kültürü ortamlarında üretilmemesi, serolojik testlerin yukarıda değinilen sınırlamaları, elektron mikroskopi ve immünohistokimya gibi klasik direkt virolojik tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllük eksikliği gibi nedenlerden dolayı, HPV enfeksiyonlarının rutin mikrobiyolojik tanısı için önerilen test formatı temel olarak viral nükleik asitlerin tespitine dayanmaktadır^{10,17}.

HPV ENFEKSİYONLARININ TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLER

HPV enfeksiyonlarının tanısı için geçmişte kullanılan filtre in-situ hibridizasyon, *Southern blot* (SB) hibridizasyon, *dot blot* (DB) hibridizasyon ve hibrid yakalama (capture) tüp deneyleri gibi yöntemler düşük duyarlılıkları nedeniyle artık kullanılmamaktadır⁸. Günümüzde klinik örneklerde HPV varlığını saptayabilmek için geliştirilmiş yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip çok sayıda tanı tekniği bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın kullanılan ve kabul görenler sinyal amplifikasyonuna dayalı teknikler¹⁶⁻¹⁸, hedef amplifikasyonuna dayalı teknikler (konsensus veya tipe özgül primerlerin kullanıldığı gerçek zamanlı PCR temelli yöntemler ve transkripsiyon bazlı sistemler)^{8,9,15,25} ve PCR ürünlerinin saptanması ve analizinde kullanılan çeşitli yöntemler^{7,20,26} olmak üzere üç ana kategoride gruplandırılabilir. Moleküler tanı yöntemleri, HPV varlığının saptanmasında kullanıldıkları gibi, HPV enfeksiyonlarının yönetiminde çok önemli olan genotiplendirme amacıyla da kullanılmaktadır. Tip tayini yapabilen yöntemlerin diğer önemli avantajları ise çoklu tip varlığını saptayabilmeleri, HPV persistansının doğrulanmasına imkan vermeleri ve minör lezyonların takibi ve tedavi sonrası izlenmesine olanak sağlamalarıdır¹⁷.

HPV-DNA tespiti; örneğin kalite ve miktarı, laboratuvarın donanım ve personel olanakları, seçilen yöntemle ait karakteristik özellikler ve uygulama tekniği gibi faktörlerden etkilenir¹¹. Bu yüzden yöntemler arasında karşılaştırma yapabilmek için örnek toplama, ekstraksiyon ve test aşaması da dahil olmak üzere HPV testinin tüm adımların dikkatle standardizasyonu gerekmektedir. Genel olarak, kullanılacak ekstraksiyon yöntemi klinik örneğin kalitesine ve uygulanacak tanı testine göre seçilmelidir. Bunun dışında, ticari test üreticileri bazı kitlelere özel ekstraksiyon yöntemleri geliştirmiş ve bunları testin bir parçası olarak sunmuşlardır⁴. Kaliteli bir DNA için taşıma ve saklama sırasında dayanıklılık da çok önemlidir. Örneğin, yanlış negatif sonuçları önlemek için viral nükleik asitler endojen endonükleazlar tarafından bozulmaya karşı korunmalıdır. Oda sıcaklığında uzun süre saklama durumunda bile nükleik asitleri moleküler tanı için yeterli düzeyde koruyabilen *PreservCyt* (CYTYC Corp, ABD) gibi ticari transport kitleri geliştirilmiştir¹¹. Ayrıca, örnekteki genomik DNA'nın bütünlüğünü ve moleküler teknikler için stabilitesini değerlendirmek için beta-globin veya gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz gibi bir internal kontrol de kullanılabilir¹⁵.

Direkt Hibridizasyona Dayalı Yöntemler

HPV-DNA klinik örneklerden izole edildikten sonra SB veya DB hibridizasyon ile doğrudan tespit edilebilir. Ancak her iki yöntem de uygulaması zor ve duyarlılığı düşük teknikler olup günümüzde rutin tanıda kullanılmamaktadır. Benzer şekilde geçmişte kullanılmış bir diğer direkt hibridizasyon yöntemi olan filtre in-situ hibridizasyon da günümüzde yerini daha gelişmiş tekniklere bırakmıştır¹⁷.

Sinyal Amplifikasyon Yöntemleri

Sinyal amplifikasyon sistemlerinde nükleik asitler ilk olarak özgün problemlerle hibridize edilir ve daha sonra bu komplekslerden üretilen sinyallerin derecesi artırılır²⁷. *Hybrid Capture* (HC) 1 ve 2 (Digene, ABD), *NextGen* (Qiagen, Almanya) ve *Invader ASRs* (Hologic, ABD) HPV tanısında kullanılan sinyal amplifikasyonu prensibi ile çalışan ticari testlerdir¹⁶⁻¹⁸. Sinyal amplifikasyon testlerinin en önemli avantajları kolay uygulanabilirlikleri ve standardize edilmiş olmalarıdır. Bununla beraber, genotip düzeyinde tanımlama yapma ve çoklu enfeksiyonları tespit etme etkinliklerinin sınırlı olması yanında saptama limitlerinin de nispeten yüksek olması başlıca dezavantajlarıdır^{8,27}.

HPV tanısına yönelik ilk HC testi olan HC1 1995 yılında Digene tarafından geliştirilmiştir. O zamandan bu yana, bir adet mikrotitre pleyti yerine tüplerin kullanıldığı ve sıvı bazlı servikal örneklerde HR-HPV tiplerinin tespitini mümkün kılan FDA onaylı ikinci nesil testler (HC2) kullanıma sunulmuştur. HC2 1999 yılında FDA tarafından yardımcı tarama testi olarak onaylanan ilk HPV testidir²⁸. Bununla beraber, FDA onayında bu testin tek başına bir tarama testi gibi kullanılmaması gerektiği ve sadece bu testten elde edilmiş sonuçlara dayanarak klinik değerlendirme veya hasta tedavisi yapılmaması gerektiği belirtilmiştir⁴. HC2 sistemi hedef DNA'nın bir solüsyon içerisinde işaretli RNA problemleri ile hibridize edilmesine dayalı radyoaktif olmayan bir sinyal amplifikasyon yöntemidir¹⁷. Test, biri beş adet LR-HPV'ye diğeri de 13 adet HR-HPV'ye ait iki prob kokteyli içerir. L1 gen bölgesini hedefleyen bu yöntemde; RNA-DNA hibridleri, bu hibridlere özgül monoklonal antikorlar ile kaplı mikrokuyucuklar üzerinde yakalanır ve ortama ikinci bir monoklonal antikor (konjugat) ve kemilüminesan substrat eklenmesiyle tespit edilir. Her antikor birkaç alkalin fosfotaz molekülü ile konjuge edilmiştir ve yakalanmış durumdaki her hibrid moleküle çok sayıda antikor bağlanabildiği için hedef virus başına yaklaşık 3000 kat göreceli sinyal amplifikasyonu üretilir. Bu yaklaşım sayesinde HPV-DNA yarı-kantitatif olarak ölçülebilmektedir^{8,11}. Birçok ülkede standart hale gelen ve yaygın olarak kullanılan HC2 testinde üretilen sinyaller, bir lüminometrede görece ışık birimleri (RLU) olarak okunur. Bilinmeyen RLU değerleri 1.0 pg/ml HPV-16 içeren bir pozitif kontrol reaksiyonuna göre karşılaştırılır ve bilinmeyen RLU/kontrol oranları > 1.0 olanlar pozitif kabul edilir. Bu kesim noktası (cut-point) yaklaşık olarak reaksiyon başına 5000 genoma eşdeğerdir. Çoklu karşılaştırma çalışmalarında 1.0 pg/ml kontrol standart kullanıldığında HC2 performansının PCR tabanlı testlerle karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir^{8,17}. Ancak HC2 testi, tüm yüksek riskli tipleri taramadığı gibi, yüksek riskli ve düşük riskli gruplar arasında ayrım yaptığı halde özgül tip tanımlaması yapamamaktadır. Tespit sınırı yaklaşık 5000 genoma eşdeğer olduğundan düşük kopya sayılı örnekleri de saptayama-

yabilir. Ayrıca iki prob kokteyli arasında çapraz reaktivite görülebilmekte ve bu durum pozitif bir sonucun klinik önemini azaltabilmektedir¹⁷. Bu dezavantajlarına rağmen, HC2 testi HPV tespiti için klinik yararlılığı kanıtlamış standart bir yöntemdir ve karşılaştırmalı değerlendirmeler için özellikle önerilmektedir¹¹.

HC2 teknolojisinin basitleştirilmiş yeni versiyonu olan *Care-HPV* (Qiagen, ABD) hızlı bir tarama testi olarak kullanıma girmiştir. Bu yöntem yaklaşık üç saat içerisinde 14 HR-HPV tipinin varlığını test edebilmektedir²⁹. Bu strateji, özellikle hasta takibinin zor olduğu düşük kaynaklara sahip bölgeler ve gelişmekte olan ülkeler için önemlidir. Özel bir nem veya sıcaklık koşulu, ya da belirli bir elektrik veya su şebekesi gibi gereksinimler olmadan herhangi bir ortamda asgari laboratuvar eğitimi olan bir sağlık çalışanı tarafından uygulanabilmesi, servikal örneklerin bir sağlık çalışanı tarafından ya da hastanın kendisi tarafından toplanabilmesi, sonuçların kısa sürede alınabilmesi ve kolay yorumlanabilmesi testin önemli avantajlarıdır. Ancak, sadece 24-90 örneğin çalışılabilmesi (manuel olarak), hasta yükünün yüksek olduğu durumlarda testin verimliliğini sınırlar¹¹. Çalışma prensibi HC2 yöntemi ile aynı olan NextGen sisteminde ise bazı iyileştirmeler yapılmış ve profile HPV-66 ve 82 eklenerek saptanabilen yüksek riskli tip sayısı 15'e çıkarılmıştır¹⁶.

Bir diğer sinyal amplifikasyon sistemi olan *Invader ASRs* yönteminde, L1 dışındaki gen bölgeleri de hedeflenmektedir. HPV-82 dışındaki 14 yüksek riskli tipi saptayan yöntem üç farklı prob kokteyli içerir¹⁸. Testin çalışma prensibi HC2 sisteminden farklıdır. Tipe özgül hibridizasyonu takiben cleavase enzimi ile parçalanan problemlerden floresans oluşması prensibi ile çalışan kalitatif bir yöntemdir. Bu yöntemde teorik olarak 10^6 - 10^7 kat amplifikasyon artışı elde edildiği ve yöntemin saptama duyarlılığının 1000-10.000 kopya/ml olduğu bildirilmiştir²⁷. Üç prob kokteylinin her birinde bulunan ve insan histon-2 genine bağlanan oligonükleotidler internal kontrol olarak işlev görür¹¹. Bu teknoloji ile çalışan *Cervista HPV HR* ve *Cervista HPV 16/18* (Hologic, ABD) olmak üzere iki farklı ticari test geliştirilmiştir. Bu testlerin her ikisi de FDA tarafından onaylanmıştır; ancak HC2 testinde olduğu gibi bu testler için verilen onayda da belirli kullanım sınırlamaları bulunmaktadır. Örneğin, bu testlerin klinik değerlendirmeler yapılırken tek başlarına kullanılmamaları ve 30 yaş altındaki normal sitolojili kadınlarda uygulanmamaları gerektiği belirtilmiştir⁴. *Cervista HPV 16/18* testi, tip tayini için onay alan ilk HPV testidir, ancak her iki tip için de aynı kimyasal kullanıldığından, servikal kanser olgularında en sık karşılaşılan bu iki tipi birbirinden tam olarak ayırt edemez^{10,18}. *Cervista* testlerinin diğer sınırlamaları ise şöyle sıralanabilir: (a) *Cervista HPV HR* testi sadece 14 HR-HPV tipini ve *Cervista HPV 16/18* sadece iki HR-HPV tipini saptayabilmektedir; (b) *Cervista HPV HR* testi risk düzeyi belli olmayan HPV tiplerinden HPV-67 ve 70 ile çapraz reaktivite gösterirken, *Cervista HPV 16/18* de yüksek riskli bir tip olan HPV-31 ile yüksek düzeyde çapraz reaktivite gösterir. Ayrıca, düşük viral kopya sayılı enfeksiyonlarda bu test ile yanlış negatif sonuçlar elde edilebilmektedir¹¹.

PCR Temelli HPV-DNA Testleri

Hedef amplifikasyonuna dayalı HPV tanı testlerinin büyük çoğunluğu, özgül nükleik asit dizilerini çoğaltma prensibine dayalı PCR temelli yöntemlerdir. PCR testlerinin sap-

tama duyarlılığı genel olarak 100 ng hücresel DNA içeren bir klinik örnekte 1-100 viral genomdur. Ancak, PCR tabanlı yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü DNA ekstraksiyon prosedürleri, klinik örneğin tipi ve yeri, örnek taşıma ve saklama şekli, primer setleri, PCR ürününün büyüklüğü, reaksiyon koşulları ve reaksiyonda kullanılan DNA polimerazın performansı gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Klasik PCR temelli sistemler çoğunlukla ikinci bir saptama ve tiplendirme tekniği içerirler²⁰. Ancak, günümüzde yaygın olarak kullanılan gerçek zamanlı PCR uygulamaları ile HPV-DNA'nın saptanması, tip tayini ve kantitatif analizler tek basamakta gerçekleştirilebilmektedir^{17,30}. Klinik örneklerde HPV-DNA varlığı aynı anda çok sayıda farklı HPV tipini saptayabilecek şekilde tasarlanan genel (konsensus) primerlerin kullanıldığı geniş spektrumlu PCR analizleri ile veya tipe özgül primerlerin kullanıldığı PCR analizleri ile araştırılabilir¹⁷. Gerçek zamanlı PCR testlerinde amplifikasyon ürünleri *SYBR Green* gibi özgül olmayan boyalar kullanılarak veya floresan boyalarla işaretlenmiş tipe özgül probalar ile görüntülenebilir¹¹. Bu iki yaklaşımın dışında, HPV enfeksiyonlarının tanısında kullanılmak üzere iş yükü ve maliyeti azaltmayı hedefleyen multipleks PCR testleri ve saptama duyarlılığını artırmayı amaçlayan *nested* PCR uygulamaları gibi PCR temelli farklı yöntemler de tanımlanmıştır^{5,14,31}. Gerçek zamanlı PCR testlerinin en önemli avantajları çok düşük konsantrasyonlardaki nükleik asitleri saptayabilmeleri, kantitatif sonuç eldesine imkan vermeleri, tekrarlanabilirliklerinin yüksek olması, farklı floresan boyaların kullanıldığı multipleks uygulamalar için elverişli olmaları ve test sonuçlarının kısa sürede alınabilmesi olarak sıralanabilir¹¹. Gerçek zamanlı PCR testlerinin gelişmiş bir örneği olan ve ticari bir test olarak kullanıma sunulan *Cobas 4800 HPV Test* (Roche, ABD) tek bir analizde 14 HR-HPV tipini saptayabilmektedir. Test HPV-16 ve 18'i özgül olarak tanımlarken, eşzamanlı olarak diğer 12 HR-HPV tipini de saptamaktadır. Bu testin HC2'ye göre en önemli avantajı HPV-16 ve 18'i özgül olarak tanımlayabilmesidir¹¹.

Konsensus PCR Testleri

Konsensus ya da genel primerler olarak adlandırılan PCR primerleri, HPV genotiplerinin geniş bir grubunu hedefleyerek klinik örneklerde tek reaksiyonda en fazla sayıda HPV tipini amplifiye edebilecek şekilde tasarlanmıştır. Bu primerler farklı HPV tiplerinin korunmuş gen bölgelerini hedefler. En yaygın kullanılan ve çeşitli ticari testlere de adapte edilmiş olan MY09/11, GP5+/6+, PGMY09/11 ve SPF 10 konsensus PCR testlerinde kullanılan primerler, L1 geninde yer alan korunmuş bölgeleri hedeflemektedir⁸. E1 geni gibi farklı bölgeleri hedefleyen çeşitli konsensus PCR primerleri de tanımlanmış ancak yaygın kullanım alanı bulmamıştır¹⁷. HPV-DNA'yı geniş spektrumlu olarak algılayabilen üç farklı primer tasarım şekli bulunmaktadır. GP5+/6+ primerlerinin yer aldığı ilk tasarım bir ileri ve bir ters primer içerir ve PCR reaksiyonları uyumsuzlukları telafi etmek için düşük bağlanma sıcaklıklarında gerçekleştirilir. İkinci sınıf konsensus PCR primerleri, primer bağlanma bölgelerindeki intertipik dizi varyasyonlarını telafi etmek için bir veya daha fazla dejenere baz içeren ileri ve ters primerlerden oluşur. MY09/11 dejenere primer seti bu grubun bir prototipi olarak kabul edilebilir. Üçüncü tasarım şekli, viral genomun aynı pozisyonuna yönelik birbirinden farklı ileri ve geri primerlerin bir kombinasyonunu içerir. Bu primerler dejenere baz içermez, fakat herhangi bir nükleotid ile eşleşebilen

inozin içerebilir. PGMY09/11 ve SPF 10 primer setleri de bu üçüncü gruba örnek olarak gösterilebilir^{8,17}. Günümüzde ilk olarak konsensus primerler ile bir ön tarama yapılması ve sonrasında bu testlerle pozitiflik saptanan örneklerde tip tayini yapabilen yöntemlere başvurulması, maliyet ve iş gücünü azaltmak adına sık başvurulmuş bir yaklaşım olmuştur⁸. Ancak, konsensus PCR testlerinin duyarlılık sorunu nedeniyle bu yaklaşımın özellikle aşı veya takip çalışmaları için önemli olan bazı verilerin atlanmasına neden olabileceği unutulmamalıdır.

İlk geliştirilen ve yaygın olarak kullanılan konsensus PCR testlerinden biri olan MY09/11 konsensus PCR sistemi, L1 gen bölgesinde yer alan yaklaşık 450 baz çifti (bp) uzunluğundaki korunmuş bir bölgeyi hedeflemektedir³². Bu yöntemin genital enfeksiyonlarda etken olarak saptanan 40'a yakın farklı HPV tipini saptayabileceği öngörülmektedir⁸. Tipler arası dizi varyasyonlarını telafi etmek için dejenere primerlerin kullanılması nedeniyle her ayrı lot numaralı seride konsantrasyonları kesin olarak belli olmayan 24 farklı primer (16 MY09 ve 8 MY11) bulunur. Bu dizaynın en önemli dezavantajı, test sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş olan duyarlılık sorunudur^{9,15}. MY09/11 primer sistemi ilk dizayn edildiğinde, HPV tiplerinden sadece HPV-6, 11, 16, 18 ve 33 bilindiğinden, sistem öncelikle bu beş türü tespit edecek şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle yanlış eşleşme olasılığının yüksek olduğu diğer HPV tipleri için duyarlılığın düşük olacağı öngörülebilmektedir^{9,32}. Nitekim, yöntemin saptama duyarlılığının HPV tiplerine göre farklılık gösterdiği çeşitli çalışmalarda açıkça ortaya konmuştur^{7,9}. Örneğin HPV-16 ve 18 tespiti için 10^{-10} kopya sayısının yeterli olabildiği, ancak HPV-35, 52, 53, 56 ve 59 için en az 10^4 ve HPV-51 için en az 10^5 kopya sayısının gerekli olduğu bildirilmiştir^{8,9}. Bu yöntemin duyarlılığını azaltılabileceği öngörülen diğer bir faktör de, hedef gen bölgesinin nispeten uzun olmasıdır (~450 bp). Bu durum, entegrasyon sırasında veya fikse dokularda hedef DNA bütünlüğünün bozulabilme riskini ve dolayısıyla da yanlış negatif sonuç olasılığını artırmaktadır⁹.

Bir diğer konsensus PCR sistemi olan PGMY09/11 PCR, MY09/11 PCR'ın duyarlılık ve özgüllüğü geliştirecek şekilde tasarlanmıştır. Bu yöntem, beşi ileri ve 13'ü ters primer olmak üzere dizileri ve konsantrasyonları bilinen toplam 18 farklı primer içerir⁷. Dejenere baz içermeyen bu primer dizaynında PCR reaksiyonları optimal bağlanma sıcaklıklarında gerçekleştirilebilmekte ve tekrarlanabilirliği yüksek sonuçlar elde edilmektedir¹⁷. PGMY09/11 PCR'ın avantajlı olduğu bir diğer nokta da, çoklu enfeksiyonları saptama etkinliğinin MY09/11 PCR'a göre daha yüksek olmasıdır⁷. HPV enfeksiyonlarının tanısı için tasarlanan bir diğer konsensus PCR yöntemi olan GP5/6 PCR ise bir ileri ve bir ters primer içerir ve L1 gen bölgesindeki yaklaşık 140-150 bp uzunluğundaki korunmuş bir gen bölgesini hedefler³³. Sonraki yıllarda yöntemin etkinliğini artırmak için hedef dizi bölgesi 3' ucundan uzatılarak GP5+/6+ primerleri dizayn edilmiştir¹³. Yaklaşık 160 bp uzunluğunda ürünlerin elde edildiği GP5+/6+ PCR ile GP5/6 yönteminin saptama duyarlılığının 10-100 kat arttığı bildirilmiştir¹¹.

Bazı konsensus primerlerinin kombine edildiği *nested* PCR uygulamaları da tanımlanmıştır. Bu yaklaşımın özellikle düşük kopya sayılı örnekler için yararlı olduğu gösterilmiştir. Örneğin, MY09/11 PCR amplifikasyonu sonrasında GP5/6 (MY/GP) veya GP5+/6+

(MY/GP+) primerleri ile *nested* PCR uygulanmış ve bu şekilde ayrı ayrı kullanılmaları ile kıyaslandığında, yöntemin duyarlılığının arttığı bildirilmiştir^{34,35}. Benzer bir *nested* PCR uygulaması, PGMY09/11 ve GP5+/6+ primerlerinin kullanılması ile gerçekleştirilmiş ve bu yaklaşımın düşük kopya sayılı örneklerde, çoklu tip varlığında ve daha fazla sayıda farklı HPV tipini saptamada MY/GP+ *nested* PCR sistemine göre daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir³¹.

Konsensus PCR testlerinin bazı önemli dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan biri, araştırılan klinik örnekte hangi tip veya tiplerin bulunduğunu tanımlayamamalarıdır. Bu nedenle konsensus PCR ile pozitif olarak değerlendirilen örneklerdeki HPV tiplerini tanımlayabilmek için blotlama, ters hibridizasyon, mikrodizi (microarray) hibridizasyon, floresan boyalı kapiller elektroforez, lumineks temelli testler ve dizi analizi gibi ek tiplendirme yöntemlerine gereksinim duyulur^{7,10-12,17,26}. Ayrıca, konsensus PCR testlerinde çoklu tip içeren örneklerde reaksiyonun bazı tipler üzerinden baskın olarak devam etmesi (tipler arası yarışma), mevcut diğer tip/tiplerin kaçırılmasına yol açabilmektedir^{7,36}. Bu nedenle, konsensus PCR testleri ile çoğaltılan ampliconlar üzerinden tiplendirme yapan tanı yöntemlerinin bazı tipleri kaçırabileceği dikkate alınmalıdır²⁶. Örneğin, MY09/11 ve PGMY09/11 konsensus PCR'nin karşılaştırıldığı bir çalışmada, MY09/11 primerleri test edilen örnekte bulunan bazı tipleri amplifiye etmede yetersiz kaldığı için, MY09/11 PCR ile saptanan çoklu enfeksiyon oranı (%33.8), PGMY09/11 PCR'ye göre (%40) daha düşük bulunmuştur⁷. Benzer şekilde, E6-bazlı multipleks tipe özgül lumineks temelli bir yöntem ile SPF 10 konsensus PCR (SPF10 LiPA) etkinliğinin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada, çoklu tip varlığında tipler arasında yarışmalı inhibisyon oluştuğu ve bunun sonucunda konsensus PCR etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir³⁶.

Tipe Özgül PCR Testleri

Tipe özgül primerlerin kullanıldığı PCR ile saptama ve tiplendirme işlemleri aynı anda yüksek duyarlılıkla yapılabilmektedir^{5,9}. Ancak 200'den fazla HPV tipinin bulunması ve 40'tan fazla tipin genital enfeksiyon etkeni olabilmesi nedeniyle, spektrumu geniş tutulan bir tipe özgül PCR protokolü için çok sayıda özgün PCR reaksiyonu gerektiğinden bu tür bir yaklaşım emek-yoğun, pahalı ve zaman alıcı olacaktır^{3,5}. Ayrıca, her bir primer setinin tipe özgüllüğünün değerlendirilmesi ve tüm reaksiyonların optimizasyonu ve standardizasyonu gerekmektedir¹¹. PCR testlerinde tipe özgül primer ve prob dizaynı için en sık tercih edilen hedefler L1 ve E6-E7 gen bölgeleridir^{5,9,14,15}. L1 gen bölgesinin entegrasyon sırasında parçalanabileceği, buna karşın E6-E7 gen bölgelerinin her zaman bütün halde olması ve dizi varyasyonlarının daha az görülmesi nedeniyle primer dizaynı için daha avantajlı olabileceği öne sürülmüştür³⁷. Buna karşın yaptığımız çalışmalar, uygun tasarım yapıldığı takdirde her iki gen bölgesinin de tipe özgül primer ve prob dizaynı için tercih edilebilir olduğunu göstermiştir^{5,15}. Tipe özgül PCR testlerinin bir diğer önemli avantajı da, çoklu tip varlığından etkilenmemesi ve her bir HPV tipine ait kantitatif veriler sunabilmesidir. Ayrıca, bu yaklaşım çok düşük kopya sayılı örneklerde bile HPV-DNA varlığını saptamaya imkan vermektedir. Tipe özgül PCR testleri, bahsedilen bu avantajlarından dolayı karşılaştırmalı çalışmalarda kullanılmakta ve çeşitli yöntemlerin HPV tiplerine veya viral DNA kopya sayısına göre değişebilen etkinliklerini değer-

lendirme olanağı sunmaktadır⁹. Tipe özgül PCR testlerinin tekli ve çoklu enfeksiyonlarda veya düşük kopya sayılı örneklerde sunduğu yüksek duyarlılıklı veriler, enfeksiyon etkeni HPV tipinin kanseröz dönüşümde iyi tanımlanmış bir risk faktörü olması nedeniyle ayrıca önem kazanmaktadır².

Multipleks PCR (M-PCR) Testleri

Çok sayıda HPV tipinin anogenital bölgede enfeksiyon etkeni olarak saptanıyor olması, HPV enfeksiyonlarında saptama ve tiplendirmeyi güçleştirmektedir⁵. Bu durum araştırmacıları multipleks sistemler geliştirmeye yönlendirmiş ve ticari ve *in-house* M-PCR testleri de dahil olmak üzere çok sayıda multipleks sistem tanımlanmıştır¹⁰. *In-house* multipleks testler genel olarak gerçek zamanlı PCR (real-time quantitative PCR; qPCR) prensibi ile çalışmakta olup, bu testlerde PCR ürünlerini saptamak için özgül probalar, farklı floroforlar veya SYBR *Green* gibi özgün olmayan boyalar kullanılabilir^{5,14,30,38}. HPV tanısı için ilk tanımlanan gerçek zamanlı multipleks PCR (M-qPCR) yöntemlerinden birinde, reaksiyon başına üç florofor kullanılarak iki reaksiyon tüpünde 10 farklı HPV tipinin varlığı araştırılmıştır³⁰. Yakın zamanda tanımlanan bir M-qPCR yönteminde ise, 13 HR-HPV ve iki PrHR-HPV tipinin beş ayrı reaksiyon tüpünde amplifiye edilerek tipe özgül TaqMan probalar ile saptanabildiği bildirilmiştir¹⁴. Laboratuvarımızda tasarlanan özgün bir yöntem olan SYBR *Green* temelli M-qPCR testi ile yaptığımız bir çalışmada, L1 ve E6-E7 genlerini hedefleyen tipe özgül primerlerle, sık karşılaşılan 16 farklı HPV tipi dört ayrı reaksiyon tüpünde araştırılmış; bu yöntemin TaqMan temelli tipe özgül qPCR testleri ile benzer duyarlılık gösterdiği, ancak maliyetinin daha düşük olduğu belirlenmiştir⁵.

HPV enfeksiyonlarının tanısında kullanılmak üzere M-PCR testlerinin kullanıldığı ticari testler de mevcuttur. Bunlardan biri olan *Abbott Real-Time HR-HPV* (Abbott, ABD) yönteminde, L1 gen bölgesini hedefleyen modifiye GP5+/6+ primerleri (üç ileri ve iki ters primer) kullanılmaktadır³⁹. Yöntem 14 farklı tipe özgül prob ile HPV-16 ve 18'i genotip düzeyinde tanımlarken, diğer tipleri 16 ve 18 dışı HR-HPV tipleri şeklinde tanımlar. Bu yöntemde, floresan probaların tespit edilmesi için dört ayrı kanal (internal kontrol, HPV-16, HPV-18 ve geri kalan 12 HR-HPV tipi için) bulunmaktadır. Testin süresi 96 örnek için 6-8 saattir ve bu süre DNA izolasyonu için kullanılan yöntemle göre değişebilir. Bu testin formalinle tespit edilmiş ve sonradan parafin içerisinde gömülmüş servikal kanser doku örneklerinde HPV tiplerinin tespiti ve kısmi genotiplendirilmesi için güvenilir, duyarlı ve özgül bir tanı yöntemi olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir⁴⁰. Bir diğer M-PCR temelli ticari test olan *F-HPV Typing Kit* (Molgentix, İspanya) HPV-73 ve 82 dışındaki 13 farklı HR-HPV tipini ve iki LR-HPV tipini (HPV-6 ve 11) saptayacak şekilde tasarlanmıştır³⁸. Yöntemde beş farklı floresan boya ile işaretlenmiş 16 primer çifti tek tüpte M-PCR ile amplifiye edilmekte ve sonrasında kapiller elektroforez ile fragman analizine tabi tutulan PCR ürünleri renk ve büyüklük farklılıklarına göre tanımlanmaktadır.

PCR Amplikonlarını Tanımlayan Yöntemler

Konsensus PCR veya tipe özgül PCR testlerinde, amplifikasyon ürünlerinin (amplikon) varlığını tespit etmek ve tanımlamak için çeşitli yöntemlere başvurulur. Örneğin, hedeflenen parçaların uzunlukları farklı olduğunda PCR ürünleri jel elektroforezi ile tanımla-

nabilir. Ancak bu yaklaşım göreceli olarak düşük duyarlılığa sahiptir ve bazı yöntemler (örneğin, MY09/11 PCR) jel ile ayırt edilmesi mümkün olmayan ampliconlar üretebilirler. Bu yüzden, bu tip deneylerin özgüllüğü ancak PCR sonrası dizi analizi ya da tipe özgül prob hibridizasyonu ile belirlenebilir¹⁷.

PCR ürünleri, direkt jel elektroforezine göre daha özgül yöntemler olan restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP), direkt dizileme veya tipe özgül oligonükleotid problemlerin kullanıldığı *dot blot/line blot* yöntemleriyle de tiplendirilebilir⁸. RFLP ve direkt dizileme ile HPV tipleri ancak tek enfeksiyon etkeni olarak bulunduklarında tanımlanabilirken, *dot blot* ve ters *line blot* yöntemleri birden fazla HPV tipinin varlığını kolayca belirleyebilmektedir⁸. Hedef ürün konsantrasyonu düşük olduğunda, PCR ürünleri jel ile görüntülenme limitinin altında olacağı için RFLP'nin duyarlılığı azalır. Çoklu enfeksiyonlarda ya da önemli ölçüde özgün olmayan ürün oluşması durumunda ise restriksiyon paternlerinin çözülmesi zorlaşmaktadır. PCR-RFLP temelli çeşitli *in-house* testlere ilave olarak bir de ticari kit bulunmaktadır. *BIOTYPAP Kit* (Biotools, İspanya) olarak piyasaya sürülen bu test ile, 31 farklı mukozal HPV tipinin ve bazı alt tiplerin saptanması ve tanımlanması yapılabilmektedir¹¹. Bu kit iki primer çiftinin kullanıldığı multipleks amplifikasyon reaksiyonu içerir. Bir primer çifti, test edilen tüm tipler için L1 ve L2 gen bölgelerinde yer alan ortak diziler (yaklaşık 450 bp) ile hibridize olur ve HPV varlığını gösterir. İkinci primer çifti ise, HR-HPV tipleri için özgül diziler (yaklaşık 250 bp) ile hibridize olur. Restriksiyon analizine tabi tutulan amplifikasyon ürünlerinin farklı paternleri, belirli HPV tiplerinin varlığını gösterir⁴¹. PCR ürünlerini tanımlamada kullanılan bir diğer yöntem ise, standart ya da yeni "pirosekanslama" teknikleri ile direkt dizi analizidir. Diğer genotiplendirme yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha iyi performans gösterdiği bildirilen dizi analizi, HPV tipleri arasındaki küçük dizi varyasyonlarını incelemeyi de mümkün kılmıştır. Ancak birden fazla HPV tipi ile oluşan çoklu enfeksiyonlarda, PCR ürünlerinin dizilerini çözmek çok zordur⁴². Bir diğer tiplendirme yaklaşımı da, işaretlenmiş oligonükleotid problemler ile PCR ürünlerinin *dot blot* hibridizasyonudur. Fakat her HPV tipi için ayrı hibridizasyonları gerektiren bu yöntem ile kapsamlı bir genotipleme için, örnek başına 40 farklı hibridizasyon probuna gereksinim olacağından emek-yoğun bir yöntemdir¹².

Bir strip (membran şerit) üzerinde paralel çizgiler şeklinde sabitlenmiş halde bulunan çok sayıda probun PCR ürünleri ile hibridizasyonu prensibiyle çalışan ters hibridizasyon teknolojisi, HPV tiplerinin ve çoklu tip varlığının tespitinde yaygın olarak kullanılan bir tanı yöntemidir^{8,17}. Bu yöntem, *line probe assay* (LIPA), *line blot assay* (LBA) veya *linear array* (LA) olarak da adlandırılır. Bu teknoloji ile çalışan birçok ticari kit geliştirilmiş ve piyasaya sürülmüştür¹⁰. Klinik veya epidemiyolojik uygulamalarda geniş spektrumlu genotiplendirme için en uygun yöntemlerden biri olan bu yaklaşım, tek bir hibridizasyon reaksiyonunda PCR ürünlerinin kapsamlı olarak genotiplendirmesini mümkün kılmıştır^{26,43}. Bu teknoloji neredeyse tüm konsensus PCR sistemleri için tarif edilmiştir¹⁰. Örneğin, Roche tarafından geliştirilen PGMY primer-bazlı prototip LBA yöntemi, günümüzde optimize edilmiş hali ile *Linear Array HPV Genotyping Assay* (LA-HPV) (Roche, ABD) adıyla kullanıma sunulmuştur. LA-HPV testiyle 37 HPV tipi genotip düzeyinde beta-globin ile eşzamanlı olarak tanımlanabilmektedir^{43,44}. Örnek olarak verilebilecek bir

diğer test olan *SPF 10 INNO LIPA Genotyping Test* (Innogenetics, Belçika) ise, 43 farklı HPV tipine ait ampliconları saptayabilirken, bunların 25'ini genotip düzeyinde tanımlayabilmektedir^{26,43,44}.

Amplifiye PCR ürünlerinin analizinde, tipe özgül DNA problemlerinin kullanıldığı mikrop-lak hibridizasyon tekniği de kullanılmaktadır. Bu yöntem, PCR ürünlerinin özgül problemler ile hibridizasyonunu takiben oluşan renk değişiminin kolorimetrik cihazlar ile analizine dayanır. Mikrop-lak hibridizasyon prensibi ile çalışan ticari bir yöntem olan *Amplicor HPV Test* (Roche, ABD), 2003 yılında piyasaya sürülmüştür¹¹. Bu teknik nükleik asit izolasyonu, PCR amplifikasyonu, hibridizasyon ve 450 nm'de absorbans analizi basamaklarını içerir. Özgün olarak L1 gen bölgesinin polimorfik bir bölgesini hedefleyen biyotin işaretli primerlerin bulunduğu bir genel primer havuzu içeren yöntem, 13 farklı HR-HPV tipine ait DNA'ları amplifiye edecek şekilde tasarlanmıştır²¹. Eşzamanlı olarak insan beta-globin geni varlığını (internal kontrol) tanımlayabilmektedir. Yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu ve LA ve HC2 testleri ile karşılaştırılabilir sonuçlar verdiği bildirilmiştir¹¹. *Amplicor HPV* testi PrHR-HPV tiplerinden HPV-26, 53 ve 66 ile HR-HPV tiplerinden HPV-73 ve 82'yi saptayamamaktadır. Ayrıca duyarlılık ve özgüllüğü yüksek ve rutin kullanımı kolay olmasına rağmen, HR-HPV var veya yok şeklinde sonuç verebilmekte, ancak özel bir tipin varlığına dair bilgi sağlamamaktadır¹¹.

PCR ürünlerinin analizinde kullanılan bir diğer yöntem mikrodizi (microarray) temelli olup, çalışma prensibi yukarıda bahsedilen mikrop-lak hibridizasyon testlerine benzerdir; ancak bu yöntemler aynı anda çok daha fazla HPV tipini özgül olarak tanımlayabilir^{10,17}. Mikrodizi tekniklerinde hibridizasyon varlığı çözünmeyen taşıyıcılar veya DNA çipleri (mikroçip, biyoçip, gen çip) ile saptanır^{45,46}. HPV-DNA saptanması ve genotiplendirme analizleri için süspansiyon içinde uygulanan mikrodizi yöntemleri (xMAP, Luminex) de geliştirilmiştir¹⁰. Bu yöntemler, özgül absorpsiyon spektrumuna sahip bir boncuk seti ile 100 farklı proba ait sinyali tek bir reaksiyonda ayrı ayrı ölçebilen gelişmiş hibridizasyon testleridir¹⁹.

HPV-RNA Amplifikasyon Testleri

HPV saptama stratejilerinin çoğunluğu DNA bazlı olmasına rağmen, özgül viral RNA'ların varlığı da nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon (NASBA) testleri veya PCR amplifikasyonu öncesinde bir ters transkripsiyon basamağı içeren gerçek zamanlı ters transkriptaz PCR (RT-qPCR) ile araştırılabilir¹⁰. HPV E6/E7 mRNA düzeylerinin tespiti, HPV-DNA saptanması, viral yük tespiti ve insan genomuna entegrasyonun gösterilmesi ile kıyaslandığında klinikte daha uyumlu sonuçlar vermektedir⁴⁷.

Çalışma prensipleri aynı olan *PreTect HPV Proofer* (NorChip, Norveç) ve *NucliSENS EasyQ HPV* (Biomérieux, Fransa) testleri NASBA teknolojisiyle çalışır. *NucliSENS EasyQ v1* testi; orijinal *PreTect HPV Proofer* yöntemi üzerinde primer ve işaretli prob konsantrasyonlarında yeni ayarlamalar yapılması, test protokolünün yeniden düzenlenmesi ve testin tekrarlanabilirliğini artırmak için beş farklı tipe ait pozitif kontrollerin ve internal kontrolün DNA formatından RNA formatına dönüştürülmesi gibi önemli değişikliklerin yapıldığı daha gelişmiş bir testtir⁴⁸. Bu yöntemler HR-HPV tiplerinden HPV-16, 18, 31, 33 ve 45'in

E6/E7 mRNA'larını kalitatif bir şekilde saptamak üzere tasarlanmış olup, gerçek zamanlı izotermal RNA amplifikasyonu ve multipleks saptama prensibiyle çalışır^{11,17,25}. İnsan U1A mRNA'sının internal kontrol olarak kullanıldığı testte, her multipleks reaksiyonda iki farklı etiketle işaretlenmiş moleküler probalar kullanılır. HPV-16, 31 ve 33'ün saptanması için florofofor olarak FAM (fluorescein) kullanılırken, U1A, HPV-18 ve 45'in saptanması için *Texas Red* kullanılır²⁵. *PreTect HPV Proofer* yönteminin analitik duyarlılığı HPV-16 ve 18 için sırasıyla yaklaşık 20 ve 25 kopya olarak bulunmuştur¹¹.

APTIMA HPV Assay (Gen-Probe, ABD) tekniği ise, transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) temelli bir yöntemdir. Bu yöntem nükleik asit amplifikasyonu ve takiben kemilüminesan işaretli prob hibridizasyonu ile HPV-82 dışındaki 14 HR-HPV tipinin E6/E7 mRNA'larını saptayabilen multipleks nükleik asit saptama testidir⁴⁹. Yöntem HR-HPV varlığı/yokluğu için pozitif veya negatif şeklinde kalitatif sonuç verirken, örnekte bulunan özgül HPV tiplerini tanımlamaz. Yöntem tek tüp içinde HPV'ye özgül yakalayıcı oligomerler ve manyetik mikropartiküller kullanılarak hedef mRNA'ların yakalanması, TMA ile hedef mRNA'ların amplifikasyonu ve amplifikasyon ürünlerinin saptanması olmak üzere üç ana basamak içerir⁵⁰. Her üç basamağın (yakalama, amplifikasyon ve saptama) performansını değerlendirmek üzere teste bir internal kontrol transkripti eklenmiştir. Testin analitik duyarlılığı yarı otomatize Direct Tube Sampling (DTS) sistemle 38-488 kopya HPV-mRNA ve tam otomatize TIGRIS DTS sistemiyle (Gen-Probe, ABD) 17-275 kopya HPV-mRNA olarak bulunmuştur¹¹. Testin yeni bir versiyonu olan *APTIMA HPV 16 18/45 Genotype Assay* (Gen-Probe, ABD), yakın zamanda HPV-16, 18 ve 45'in tip düzeyinde tanımlanması için piyasaya sürülmüş ve FDA onayı almıştır⁵¹.

Özgül viral RNA'ların varlığı RT-qPCR yöntemleriyle de araştırılabilir^{8,17}. Örneğin, HPV-16 ve 18'in E7 transkriptlerini tespit etmek için RT-qPCR temelli bir test geliştiren Lamarcq ve arkadaşları⁵², tanımladıkları yöntemin semptomatik enfeksiyonların tespitinde özgül sonuçlar verdiğini ifade etmişlerdir. Benzer şekilde Wang-Johanning ve arkadaşları⁵³, HPV-16 E6/E7 mRNA'larını hedefleyen bir RT-qPCR testi tanımlamışlar ve E6/E7 protein ekspresyonlarının lezyonun şiddeti ile uyumlu olarak arttığını göstermişlerdir⁵³. RT-PCR ile HPV-16 E6 proteininin araştırıldığı ve aynı yöntemin modifiye edilerek *nested* RT-PCR yöntemi ile saptama etkinliğinin artırıldığı farklı RT-PCR uygulamaları da bulunmaktadır^{54,55}.

Diğer Moleküler Tanı Yöntemleri

HPV genomunun fiziksel durumu da potansiyel bir tanısal belirteç olarak incelenmiştir. Bu amaçla insan genomuna entegre formda bulunan viral DNA'yı saptamak üzere PCR temelli protokoller geliştirilmiştir⁵⁶. Entegre HPV genomlarının varlığını saptamak için RT-PCR ve ligasyon aracılı PCR ile viral transkriptlerin gösterilmesi yöntemleri denenmiştir^{57,58}.

Yeni kullanıma giren ve HPV enfeksiyonlarının tanısı için de adapte edilen bir yöntem olan protein mikrodizi teknikleri mikroorganizmalara ait antijenlerin ve bu antijenlere karşı oluşan hümmoral immün yanıtın çok düşük düzeylerinin bile araştırılmasına imkan vermiştir. Bu yaklaşım, hedef genlerin PCR ile amplifikasyonu, in-vivo rekombinasyon

(klonlama), proteinlerin in-vitro ekspresyonu ve mikroçipler üzerine yazdırılması sonrasında serumdaki antikor yanıtının saptanması prensibine dayanır. Luevano ve arkadaşları²⁴, anogenital kanserlerle ilişkili yedi (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 45 ve 53), genital ve laringeal siğillerle ilişkili iki (HPV-6 ve 11) ve cilt lezyonları ile ilişkili dört (HPV-1, 2, 4, 5) HPV tipi olmak üzere toplam 13 farklı HPV tipi tarafından kodlanan sekiz proteinin tümünü araştırmaya imkan veren bir protein mikroçip yöntemi tanımlamışlardır.

MALDI-TOF kütle spektrometresi, HPV enfeksiyonlarının tanısı için kullanılmaya başlayan bir diğer yeni yöntemdir. Üç farklı yöntemin kombine edildiği PCR-RFMP (restriksiyon fragman kütle polimorfizmi) testinde; PCR amplifikasyonu, restriksiyon enzimi ile parçalama ve MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analiz basamakları bulunmaktadır. Bu yöntemin basit ve hızlı (4-4.5 saat) bir protokol ile en az 74 farklı HPV tipini doğru bir şekilde tespit edebildiği bildirilmiştir⁵⁹.

SONUÇ

Bu yazıda sadece bir kısmına değinilen tanısal yöntemlerin çeşitliliği, mikrobiyoloji alanında kullanılan moleküler tekniklerin neredeyse tümünün HPV enfeksiyonlarının tanısı için de uyarlandığını ve yeni geliştirilen her tekniğin kısa bir zaman sonra HPV tanısında kullanılabilirliği açısından ele alındığını göstermektedir. Her bir yöntemin farklı avantaj ve dezavantajları olduğu dikkate alınarak, epidemiyolojik araştırmalar, klinik değerlendirmeler ve hasta takibi gibi özel amaçlara uygun yöntemlerin seçilmesi gerektiği söylenebilir. Bir diğer önemli nokta da, HPV enfeksiyonlarının yönetiminde moleküler testlerden elde edilen sonuçların tek başına kullanılmasının çeşitli sakıncalarının olabileceğidir. Bu nedenle moleküler testlerden elde edilen sonuçlar, diğer tanı ve tarama testlerinin sonuçları, fizik muayene ve hastanın ayrıntılı tıbbi geçmişinden elde edilen klinik bilgiler ile kombine edilerek değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Şahiner F, Gümrall R. Human papillomavirus enfeksiyonları ve ilişkili kanserler. FLORA 2012; 17(3): 93-102.
2. Muñoz 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.
3. Şahiner F, Şener K. Human papilloma virus enfeksiyonları, risk faktörleri ve koruyucu önlemler. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni 2013; 12(6): 715-22.
4. Lenhoff A. Five FDA-approved HPV assays. MLO Med Lab Obs 2012; 44(7): 14, 16, 18.
5. Şahiner F, Kubar A, Yapar M, Şener K, Dede M, Gümrall R. Detection of major HPVs by a new multiplex real-time PCR assay using type-specific primers. J Microbiol Methods 2014; 97: 44-50.
6. Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. Int J Cancer 1999; 82(2): 203-7.
7. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. J Clin Microbiol 2000; 38(1): 357-61.
8. Gravitt PE, Viscidi RP. Measurement of exposure to human papillomaviruses, pp: 119-41. In: Rohan TE, Shah KV (eds), Cervical Cancer: From Etiology to Prevention. 2004, Kluwer Academic Publishers, Boston.

9. Depuydt CE, Boulet GA, Horvath CA, Benoy IH, Vereecken AJ, Bogers JJ. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *J Cell Mol Med* 2007; 11(4): 881-91.
10. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8(10): 1139-62.
11. Dutra I, Foroni I, Couto AR, Lima M, Bruges-Armas J. Molecular diagnosis of human papillomavirus, pp: 203-46. In: Vanden Broeck D (ed), *Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - Research Aspects*. 2012, InTech, Rijeka, Croatia.
12. Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital HPV infection using consensus PCR, pp: 131-52. In: Herrington CS, McGee JO'D (eds), *Diagnostic Molecular Pathology: A Practical Approach*. 1992, Oxford University Press, Oxford, UK.
13. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76(Pt 4): 1057-62.
14. 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): 261-8.
15. Şahiner F, Gümral R, Şener K, Yiğit N, Dede M, Yapar M, Kubar A. Servikal sürüntü örneklerinde iki farklı yöntemle HPV-DNA varlığının araştırılması: MY09/11 konsensus PCR ve tipe özgül gerçek zamanlı PCR. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(4): 624-36.
16. Eder PS, Lou J, Huff J, Macioszek J. The next-generation Hybrid Capture High-Risk HPV DNA assay on a fully automated platform. *J Clin Virol* 2009; 45(Suppl 1): S85-92.
17. 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.
18. Stillman MJ, Day SP, Schutzbank TE. A comparative review of laboratory-developed tests utilizing Invader HPV analyte-specific reagents for the detection of high-risk human papillomavirus. *J Clin Virol* 2009; 45(Suppl 1): S73-7.
19. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2): 504-12.
20. Takács T, Jeney C, Kovács L, Mózes J, Bencsik M, Sebe A. Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *J Virol Methods* 2008; 149(1): 153-62.
21. Gillio-Tos A, De Marco L, Ghisetti V, et al. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. *J Clin Virol* 2006; 36(2): 126-32.
22. Cuzick J, Mayrand MH, Ronco G, Snijders P, Wardle J. Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine* 2006; 24(Suppl 3): S3/90-7.
23. Lambert PF, Collins A. Papillomaviruses: Molecular biology of human viruses, pp: 18-26. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (eds), *Encyclopedia of Virology*. 2008, 3rd ed. Academic Press, Oxford, England.
24. Luevano M, Bernard HU, Barrera-Saldaña HA, et al. High-throughput profiling of the humoral immune responses against thirteen human papillomavirus types by proteome microarrays. *Virology* 2010; 405(1): 31-40.
25. Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrøm T, Karlsen F. PreTect™ HPV-Proofer: Real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J Virol Methods* 2007; 142(1-2): 204-12.
26. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8): 2508-17.
27. Handricks DA, Comanor L. Signal amplification-based techniques, pp: 19-64. In: Lorincz A (ed), *Nucleic Acid Testing for Human Disease*. 2006. CRC/Taylor & Francis, New York.

28. Malloy C, Sherris J, Herdman C. HPV DNA Testing: Technical and Programmatic Issues for Cervical Cancer Prevention in Low-Resource Settings. PATH, 2000. Available at: <http://screening.iarc.fr/doc/HPV-DNA-Testing-Issues.pdf>
29. Qiao YL, Sellors JW, Eder PS, et al. A new HPV-DNA test for cervical-cancer screening in developing regions: a cross-sectional study of clinical accuracy in rural China. *Lancet Oncol* 2008; 9(10): 929-36.
30. 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(7): 3221-8.
31. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods* 2004; 122(1): 87-93.
32. Harnish DG, Belland LM, Scheid EE, Rohan TE. Evaluation of human papillomavirus-consensus primers for HPV detection by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1999; 13(1): 9-21.
33. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990; 71(Pt 1): 173-81.
34. Evander M, Edlund K, Bodén E, et al. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992; 30(4): 987-92.
35. Strauss S, Jordens JZ, Desselberger U, Gray JJ. Single-tube real-time nested polymerase chain reaction for detecting human papillomavirus DNA. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9(3): 151-7.
36. van Alewijk D, Kleter B, Vent M, et al. A human papilloma virus testing algorithm comprising a combination of the L1 broad-spectrum SPF10 PCR assay and a novel E6 high-risk multiplex type-specific genotyping PCR assay. *J Clin Microbiol* 2013; 51(4): 1171-8.
37. Morris BJ. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(11): 1171-7.
38. Cañadas MP, Darwich L, Sirera G, et al; HIV-HPV Can Ruti Study Group. Human papillomavirus 16 integration and risk factors associated in anal samples of HIV-1 infected men. *Sex Transm Dis* 2010; 37(5): 311-5.
39. Tang N, Huang S, Erickson B, et al. High-risk HPV detection and concurrent HPV 16 and 18 typing with Abbott RealTime High Risk HPV test. *J Clin Virol* 2009; 45(Suppl 1): S25-8.
40. Kocjan BJ, Seme K, Poljak M. Comparison of the Abbott RealTime High Risk HPV test and INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test for the detection of human papillomaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded cervical cancer specimens. *J Virol Methods* 2011; 175(1): 117-9.
41. Kay P, Meehan K, Williamson AL. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J Virol Methods* 2002; 105(1): 159-70.
42. Vernon SD, Unger ER, Williams D. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 651-5.
43. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10): 3020-7.
44. van Hamont D, van Ham MA, Bakkers JM, Massuger LF, Melchers WJ. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9): 3122-9.
45. Klaassen CH, Prinsen CF, de Valk HA, Horrevorts AM, Jeunink MA, Thunnissen FB. DNA microarray format for detection and subtyping of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 2152-60.
46. Park TC, Kim CJ, Koh YM, et al. Human papillomavirus genotyping by the DNA chip in the cervical neoplasia. *DNA Cell Biol* 2004; 23(2): 119-25.

47. Andersson S, Hansson B, Norman I, et al. Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol* 2006; 29(3): 705-11.
48. Jeantet D, Schwarzmann F, Tromp J, et al. NucliSENS EasyQ HPV v1 test - Testing for oncogenic activity of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2009; 45 (Suppl 1): S29-37.
49. Getman D, Ayier A, Dockter J, Giachetti, C, Zhang F, Ginocchio CC. Efficiency of the APTIMA HPV Assay for detection of HPV RNA and DNA targets. *J Clin Virol* 2009; 4 (Suppl 1): S49-54.
50. Dockter J, Schroder A, Eaton B, et al. Analytical characterization of the APTIMA HPV Assay. *J Clin Virol* 2009; 45 (Suppl 1): S39-47.
51. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, et al. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer* 2013; 108(4): 908-13.
52. Lamarcq L, Deeds J, Ginzinger D, Perry J, Padmanabha S, Smith-McCune K. Measurements of human papillomavirus transcripts by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in samples collected for cervical cancer screening. *J Mol Diagn* 2002; 4(2): 97-102.
53. Wang-Johanning F, Lu DW, Wang Y, Johnson MR, Johanning GL. Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using real-time polymerase chain reaction analysis. *Cancer* 2002; 94(8): 2199-210.
54. Sotlar K, Selinka HC, Menton M, Kandolf R, Bültmann B. Detection of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogene transcripts in dysplastic and nondysplastic cervical scrapes by nested RT-PCR. *Gynecol Oncol* 1998; 69(2): 114-21.
55. Cornelissen MT, Smits HL, Briët MA, et al. Uniformity of the splicing pattern of the E6/E7 transcripts in human papillomavirus type 16-transformed human fibroblasts, human cervical premalignant lesions and carcinomas. *J Gen Virol* 1990; 71(Pt 5): 1243-6.
56. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 886-91.
57. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999; 59(24): 6132-6.
58. Luft F, Klaes R, Nees M, et al. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 92(1): 9-17.
59. Hong SP, Shin SK, Lee EH, et al. High-resolution human papillomavirus genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Protoc* 2008; 3(9): 1476-84.