

자궁경부 세포진 검사 이상과 자궁경부 종양 소견을 보인 환자에서 제한효소질량다형성 분석과 DNA chip을 통한 인유두종 바이러스 유전자형 검사의 유용성 비교

정현재 · 김성남¹ · 이은희¹ · 지미선¹
김민아² · 황선영 · 조희정 · 김수옥
홍선표

(주)진매트릭스 중앙연구소
'녹십자의료재단 진단검사의학과
'서울대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2006년 9월 20일
게재승인 : 2006년 11월 8일

책임저자 : 홍 선 표
우 449-913 경기도 용인시 기흥구 보정동 314
(주)진매트릭스 중앙연구소
전화: 031-260-9089
Fax: 031-260-9087
E-mail: sunphong@genematrix.net

*본 연구과제는 대한민국 과학기술부(MO-ST)와 한국과학재단(KOSEF)의 특정연구개발사업 프로그램(M10640010000-06N4-001-00210)의 지원을 받아 이루어졌음.

자궁경부암은 전 세계적으로 유방암에 이어 두 번째로 흔한 여성암이다. 한국에서는 유방암, 위암, 대장암에 이어 네번째로 많이 발생하는 암으로 매년 약 5,000명 정도의 환자가 발생하고, 발병률은 인구 100,000명당 15.3명으로 보고되고 있다. 자궁경부암의 주된 발생 원인으로 알려진 인유두종 바이러스(HPV)는 게놈(genome) 염기서열의 유사성에 따라 현재 80종 이상의 유전자형이 발견되었고, 이 중 40여 종이 생식기를 감염시키는 것으로 알려져 있다.¹

HPV 유전자형은 발암 발생기전과 관련하여 크게 고위험군

(high risk group)과 저위험군(low risk group)으로 나뉜다. 고위험군에 속하는 아형으로는 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82이 있고, 발암 발생과 관련이 적은 저위험군으로는 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 등으로 보고된 바 있다.^{2,3} HPV 감염 여부를 확인하기 위한 분자유전학적 방법으로는 line probe assay, hybrid capture, HPV type-specific probe를 이용한 southern blot, dot blot, filter *in situ* hybridization, type-specific PCR, general-primer PCR, DNA chip과 RFLP, sequencing 등이 알려져 있으며, 이 중에서 국

Comparison of Efficacy of Human Papilloma Virus Genotyping Assays using Restriction Fragment Mass Polymorphism and DNA Chip Analysis in Patients with Abnormal Pap Smear and Uterine Cervical Cancer

Hyun Jae Chung, Sung-Nam Kim¹, Eun Hee Lee¹, Mi Sun Jee¹, Min A Kim², Sun Young Hwang, Hee Jung Cho, Soo-Ok Kim and Sun Pyo Hong

R&D Center, GeneMatrix Inc., Yongin; Green Cross Reference Laboratory¹, Seoul; Department of Pathology², Seoul National University School of Medicine, Seoul, Korea

Background : High-risk human papilloma virus (HPV) infection is the primary cause of cervical cancer; there is a need for more sensitive and reliable methods for HPV genotyping to use as screening tools for early detection and intervention. **Methods :** A novel MALDI-TOF MS-based assay, termed Restriction Fragment Mass Polymorphism (RFMP) was developed for multiple HPV genotyping. Its performance was compared with DNA chip technology. The study was based on 164 cases classified as normal (n=40), ASCUS (n=53) and invasive squamous cell carcinoma (SCC, n=71) by a PAP smear and/or cervical colposcopic biopsy. **Results :** High-risk genotypes were detected in 7.5%, 47.2% and 97.2% in normal, ASCUS and SCC groups by RFMP, and in 20.0%, 41.5% and 90.1% using DNA chip technology, respectively. The results showed substantial concordance, with a kappa coefficient of 0.688, between the methods. Diagnostic sensitivity and specificity for cervical cancer were found to be 97.2% and 92.2% with RFMP and 90.1% and 80.0% using DNA chip microarrays. **Conclusions :** RFMP and DNA chip technologies were shown to be reliable methods for HPV genotyping with a high concordance. The improved sensitivity and specificity should make RFMP a viable option for the management of women with cervical neoplastic lesions.

Key Words : Human papillomavirus; Genotype; Matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry

내 HPV DNA 검사 시에는 hybrid capture assay, HPV DNA chip (microarray) 등을 주로 사용하고 있다.⁴⁻¹²

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)는 analyte의 고유 질량을 측정함으로써, 유전체학(genomics), 단백질체학(proteomics) 및 진단(diagnosics) 분야 등 다양한 생물과학 분야에서 유용성과 정확성이 장점으로 보고된 바 있다. MALDI-TOF MS를 이용한 유전자 분석 기법으로 최근 개발된 RFMP법은 유전자 내 변이가 밀집한 부위(genotype-specific motifs)를 직접 절단해내고, 조각난 유전자 절편(genotype-diagnostic fragments)의 질량을 측정함으로써 유전자형을 파악하는 범용적 기술이다. RFMP 유전자 분석 방법은 간염 바이러스(HBV, HCV) 임상 진단 분야에서 정확도, 민감도, 대용량 처리능력 및 광범위 유전자형 진단 해상도 등이 뛰어나 국내외에 차세대 유망 신기술로 소개된 바 있다.¹³⁻¹⁹ 이에 본 연구에서는 RFMP 방법을 이용하여 HPV 유전자형 진단법을 확립함으로써 조기에 민감하고 특이하게 감염된 HPV의 정확한 유전형을 분석하고, 기존의 DNA chip 법과 비교 분석함으로써 임상적 유용성과 성능을 평가하고자 하였다.

재료와 방법

연구 재료

2003년 3월부터 12월 사이에 의료법인 녹십자의료재단 종합검진센터 임상병리과를 찾은 164명의 여성을 대상으로 하였다(평균 연령 45.4세). 세포진 검사(Papanicolaou smear)에서 정상 소견을 보인 40명, 미확정 비정형 편평세포(ASCUS)의 상피세포 이상 소견을 보인 53명, 세포진 검사에서 양성 소견을 보인 후 질확대경 조준 하에서 생검을 시행하여 자궁경부암으로 진단된 71명의 자궁경부 조직 검체로 구성되었다.

검체 채취

자궁경부 세포진 검사를 위해 환자의 자궁경부 내막(endocervix)을 360°로 원을 그리듯 세 차례 회전시켜 세포를 채취하여 검체를 슬라이드에 도말한 다음 95% 에탄올에 고정하였다. RFMP HPV 유전자형 검사를 위하여 각각의 kit 내에 들어 있는 cyto-brush를 이용해 자궁경부와 외구의 세포를 충분히 채취한 다음 수송배지(transport medium)에 즉시 담가 검사실로 이송하였다.

연구 방법

RFMP법을 이용한 HPV 유전자형 분석

염기서열 다정렬(multiple alignment)한 후 HPV 유전자형

에 따라 염기서열이 특이한 motifs (nucleotide number 6604-6625)를 선정하였다. 상기의 genotype-specific motifs의 flanking 부위에 결합하고 type IIS 제한효소 인지 부위가 삽입된 두 쌍의 중합효소연쇄반응(PCR) 프라이머를 기존에 보고된 RFMP법을 응용하여 제작함으로써,¹⁹ 해당 제한효소로 PCR 산물을 절단할 경우 genotype-specific motifs를 포함하는 oligomers (genotype-diagnostic fragments)가 생산되도록 하였다.

RFMP를 위한 PCR 반응에 사용된 PCR 프라이머로는 순방향 HPV-RFMP-F, 5'-GCMCAGGGHCAYAAAGGATGAA-TGG-3' (nucleotide number 6584-6603), 역방향 HPV-RFMP-R, 5'-GTACTDCKDGRGTATCHACMACGGATG-TAACAAA-3' (nucleotide number 6657-6626)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 염기서열 아래 그어진 밑줄은 인위적으로 삽입된 *FokI* (*BstF5I*의 isoschizomer)의 인지 부위를 표시한다. 염기 번호는 NCBI GenBank accession number AY686584를 준용하였다. Qiagen 사의 QIAamp® DNA Blood Mini kit (Cat. No.51106)를 사용하고 제조사의 매뉴얼을 준수하여 검체에서 핵산을 정제해냈다. Kwok & Higuchi의 가이드라인을 준수하여 위양성을 방지하였다.²⁰ HPV DNA는 QIAamp® DNA Blood Kit (QIAGEN Inc, Chatworth, CA, USA)를 이용하여 제조사의 방법대로 분리하였다.

1차 중합효소연쇄반응은 PGMY09/11 시스템을 이용하여 증폭하였으며,²¹ 그 후 2차 중합효소연쇄반응은 Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbac, CA, USA) 0.4 units, 양방향 프라이머 각각 0.4 μ M, 0.2 mM dNTP, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)이었다. PCR은 94°C에서 5분 간 초기 변성을 시킨 후, 94°C에서 15초, 45°C에서 15초, 72°C에서 30초씩 50회 반복하였다. 증폭된 산물은 제한효소절단 반응액 10 μ L와 혼합하였다. 반응액은 5 mM potassium acetate, 2 mM Tris-acetate, 1 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol 및 각각의 제한효소 1 unit으로 만들었다. *FokI* 제한효소(NEB, Boston, MA, USA)에 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 연속하여 *BstF5I* 제한효소(NEB, Boston, MA, USA)에 45°C에서 2시간 반응시켰다.

PCR 산물을 제한효소로 절단하면 두 쌍의 7 mer, 12 mer, 13 mer로 구성된 genotype-diagnostic fragments가 생성되는데(Fig. 1), 제한효소 절단 산물을 well 당 5 mg polymeric sorbent를 함유한 384-well sample preparation plate (Waters, Milford, MA, USA)를 이용해 진공여과(vacuum filtration)하였다. 진공이 부하된 상태에서 각 well을 1 M triethylammoniumacetate (TEAA, pH 7.6) 90 μ L로 equilibration하였다. Well마다 PCR/제한효소절단반응액 28 μ L와 1 M TEAA (pH 7.6) 70 μ L를 가하였다. 0.1 M TEAA (pH 7.0) 85 μ L로 5회 rinse 한 후 vacuum manifold에 장착하고, 60% aqueous isopropanol 60 μ L로 용출하여 collection plate (Waters, Milford, MA, USA)에 모았다. Collection plate를 heating block을 이용

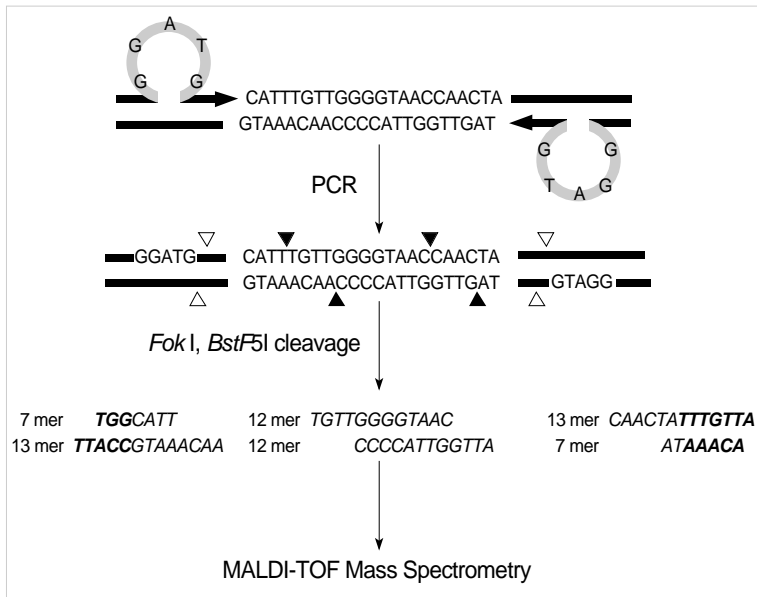


Fig. 1. Schematic diagram of the RFMP HPV genotyping strategy. PCR was performed with primers designed to introduce a type IIS restriction endonuclease recognition sequence (GGATG; *FokI*) ahead of the genotype-specific motifs on amplification. The enzymatic digestion of the products released a pair of 7 mer, 11 mer, 13 mer fragments representing nucleotide sequences shown in *bold italic*, and then masses of the resulting oligonucleotide fragments were analyzed by the mass spectrometer. Cleavage sites of *FokI* and *BstF5I*, an isoschizomer for *FokI*, are indicated by *solid* and *open* triangles, respectively.

해 115°C에서 90분 간 방치하였다. Desalted reaction mixture를 50 mg/mL 3-hydroxy picolinic acid (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 0.05M ammonium citrate picolinic acid (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 30% acetonitrile picolinic acid (Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 함유한 matrix solution과 재현탁한 후 3 µL을 384-well anchorchip plate (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)에 점적하였다. Linear MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Biflex IV, Billerica, MA, USA) workstation을 이용해 mass spectra를 negative ion, delayed extraction mode로 얻었다. 각 20-50개의 laser pulse로부터 time-of-flight data를 transient digitizer에 기록하였고, averaged spectra를 workstation에 내장된 data processing software (Bruker DataAnalysis for TOF 1.6m)를 통해 mass로 전환하였다. 얻어진 각 질량 값을 유전자형 별로 예상되는 질량 패턴 (Table 1)과 비교하여 유전자형을 결정하였다.

HPV DNA Chip을 이용한 HPV 유전자형 분석

HPVDNAChip™ (Biomedlab, Korea) system은 22개의 type-specific probe를 가지고 있다.^{11,12} 15가지의 고위험군(HPV-16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69)과 7가지의 저위험군(HPV-6, 11, 34, 40, 42, 43, 44)으로 구성되어 있다. 자궁경부 검체를 HC II에서 사용한 동일한 cytobrush를 이용하여 가검물을 채취한 후 1 mL의 1XPBS를 첨가한 다음 10분간 1,200 rpm으로 원심분리하였다. 10 µL의 0.1N NaOH/2M NaCl을 가하여 95°C에서 10분 간 중탕하였다. 그런 다음 90 µL의 TE buffer에 녹여서 DNA 분리 kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 HPV DNA를 추출하였다. DNA를 분리한 다음 GP5+/GP6d+ primers (GP5d+, 5'-TTTKTTACHGTKG-TDGATACYAC-3'; GP6d+, 5'-GAAAHATA AAYTGY-

AADTCATAYTC-3'; K, G/T; H, T/A/C; D, A/T/G; Y, T/C)를 사용하여 인유두종 바이러스를 증폭시켰다.

DNA 증폭 여부를 판단하기 위한 control로 beta-globin을 이용하였고 GPPC03/PC04 primers (PC03, 5'-ACACAAGTG-TGTTCACTAGC-3'; PC04, 5'-CAACTTCATCCACGTT-CACC-3')로 증폭하였다. 중합효소연쇄반응(PCR)은 94°C에서 5분 간 초기 변성을 시킨 후, 94°C에서 1분, 50°C에서 2분, 72°C에서 30초 간 5주기로 수행하였다. 그런 다음 다시 94°C에서 1분, 50°C에서 2분, 72°C에서 15초 간 30주기를 수행하여 HPV DNA를 증폭시켰다. 이 증폭산물은 72°C에서 5분 간 항온하여 증폭을 완료한 후, 4°C에서 보관하여 HPV DNA를 증폭시켰다. HPV PCR product 10 µL, beta-globulin PCR product 5 µL와 멸균수 25 µL에 3N NaOH 4 µL를 첨가하여 실온에서 5분 간 방치하였다. 그런 다음 1M Tris-HCl 2 µL와 3N HCl 4 µL를 가한 후 얼음 위에서 5분 간 방치하였다. 그리고 나서 12X SS-PE 50 µL와 10% SDS 0.5 µL를 첨가하여 40°C에서 교잡반응 후 세척하였다. DNA Chip scanner (GSI Lumonics, Ottawa, Canada)를 이용하여 발색된 소식자의 종류에 따라 HPV DNA 유전자형을 확인하였다.

HPV PCR 및 염기서열 분석

HPV PCR은 PGMY09/11 primers 세트를 이용하여 증폭하였으며,²¹ 증폭된 산물을 동일한 primers 세트를 이용하여 Big-Dye^R Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, CA, USA)로 염기서열 분석 반응을 시행하였다. 염기서열을 해석, 비교하기 위해 Los Alamos National Laboratories HPV Database (<http://hpv-web.lanl.gov>)에서 HPV reference sequence를 취하였다. 특히 L1 유전자에서 잘 보존된 염기서열 부분과 유전자형에 특이적인 염기서열 부분을 Clustal X

Table 1. Expected masses of oligonucleotides resulting from restriction enzyme digestion of PCR products according to HPV genotypes

Genotype	Expected Fragment Sequence	Expected Molecular Weight (Da)						Risk
		7 mer	13 mer	12 mer	12 mer	13 mer	7 mer	
16	A A T G G C A T T T G T T G G G G T A A C C A A C T A T T T	2191.4	4006.6	3796.4	3692.4	4003.6	2177.4	High
18	-----TG-----C----CA----T---T-----	2222.4	3991.6	3740.4	3715.4	4018.6	2177.4	
31	-----T-----C---T---GT-----	2206.4	3990.6	3796.4	3661.4	4034.6	2177.4	
33	-----T-----C---T---GG-----	2206.4	3990.6	3796.4	3637.4	4059.6	2177.4	
35	-----T-----A-----T-G---	2206.4	3990.6	3780.4	3691.4	4034.6	2162.4	
39	-----T--A-----CA---T---T-----	2215.4	3981.6	3755.4	3715.4	4018.6	2177.4	
45	-----T-----CA---T---GT-G---	2206.4	3990.6	3755.4	3700.4	4050.6	2162.4	
51	-----C---AAC---T---G---T---	2191.4	4022.6	3749.4	3707.4	4010.6	2186.4	
52	-----A-----C---T---GT-G---	2200.4	3997.6	3796.4	3661.4	4050.6	2162.4	
56	-----C-----T---T-----	2191.4	4022.6	3796.4	3660.4	4018.6	2177.4	
58	-----C-----C---T---GT-----	2191.4	4022.6	3781.4	3661.4	4034.6	2177.4	
59	-----T--A-----CAC---T---T-G---	2215.4	3981.6	3740.4	3731.4	4034.6	2162.4	
67	-----T--A--C-----T---A-----	2215.4	3997.6	3796.4	3651.4	4027.6	2177.4	
68	-----T-----CA---T---T-----	2206.4	3990.6	3755.4	3715.4	4018.6	2177.4	
69	-----C-----C---T---G---	2191.4	4006.6	3781.4	3692.4	4034.6	2162.4	
26	-----T--C-----C---T---T-G---	2191.4	4006.6	3796.4	3676.4	4034.6	2162.4	
53	-----C-----AAC---T---GT-----	2176.4	4022.6	3764.4	3691.4	4034.6	2177.4	
66	-----A--C-----T---GG-----	2200.4	4013.6	3796.4	3621.4	4059.6	2177.4	
70	-----C-----CA-----GT-G---	2191.4	4006.6	3740.4	3716.4	4050.6	2162.4	
MM4	-----C---AA---T---G---T---	2191.4	4022.6	3764.6	3691.4	4010.5	2186.4	
6	-----T-----T-----G---	2206.4	3990.6	3811.4	3676.4	4019.6	2162.4	
11	-----T-----C-----A-----CT-G---	2206.4	4006.6	3790.4	3692.4	4010.6	2162.4	
34	-----C---CA---T---G---	2191.4	4022.6	3740.4	3731.4	4019.6	2162.4	
40	-----A---TT--C---T---GT-----	2200.4	3997.6	3746.4	3709.4	4034.6	2177.4	
42	-----T--A-----A---T---G-----	2215.4	3981.6	3820.4	3652.4	4019.6	2177.4	
43	-----TT--G---T---GT-G---	2191.4	4006.6	3786.4	3669.4	4050.6	2162.4	
44	-----T-----A---T---GT-----	2206.4	3990.6	3820.4	3636.4	4034.6	2177.4	
54	-----T-----C---T---GG-G---	2206.4	3990.6	3796.4	3676.4	4034.6	2162.4	
55	-----T-----G---T---GT-----	2206.4	3990.6	3836.4	3621.4	4034.6	2177.4	
61	-----T-----TT---TG---T-G---	2206.4	3990.6	3761.4	3668.4	4074.6	2162.4	
72	-----C-----TT---TG-G---T---	2176.4	4022.6	3761.4	3669.4	4050.6	2186.4	
7	-----TT---TG-GT-----	2191.4	4006.6	3761.4	3653.4	4074.6	2177.4	
13	-----T--A-----C---T---CT-G---	2215.4	3981.6	3796.4	3701.4	4010.6	2162.4	
30	-----C-----GG-----	2191.4	4005.6	3781.4	3653.4	4059.6	2177.4	
57	-----ATG-GC-G---CA-T-GG-TCT--G	2216.4	3998.6	3781.4	3637.4	4035.6	2202.4	
62	-----T-----TT---TG---G---	2206.4	3990.6	3761.4	3684.4	4059.6	2162.4	
64	-----A-----CA---T---G---	2215.4	3981.6	3755.4	3731.4	4019.6	2162.4	
74	-----T-----T---T-----	2206.4	3990.6	3811.4	3660.4	4018.6	2177.4	
81	-----TT---TG--A-G---	2191.4	4006.6	3761.4	3659.4	4083.6	2162.4	
90	-----T--C--C-----T---G---T---	2191.4	4006.6	3796.4	3661.4	4010.6	2186.4	
MM8	-----T--A--C---TT---T---T-G---	2215.4	3997.6	3746.4	3708.4	4034.6	2162.4	

와 Genedoc 프로그램을 이용하여 분석하였다.²²

결 과

통계학적 분석

통계 처리는 SAS 통계 패키지 version 8 (SAS Institute Inc., NC, USA)을 이용하였다. 각 군별로 RFMP와 DNA chip 결과의 유의성을 Mantel-Haenszel 카이제곱 검정법, Kochen의 Kappa 일치도 검정법 등으로 분석하였으며, p 값이 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

RFMP HPV Genotyping 결과 및 유전자형 빈도

특정 제한효소의 인지 부위를 포함하며 바이러스 유전자형 결정 부위의 upstream이나 downstream에 결합하는 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 하고, 해당 제한효소로 절단하면, 유전자형 결정 부위를 포함하는 oligomers (genotype-diagnostic fragments)가 형성된다. RFMP법은 이의 질량을 MALDI-TOF MS에서 측정함으로써 유전자형 결정 부위의 서열을 파악하는

Table 2. Comparison of HPV genotyping results of RFMP and DNA chip assays according to pathology

Assays	Pathology		
	Normal (n=40)	ASCUS (n=53)	SCC (n=71)
RFMP			
Positive	3 (7.5)	25 (47.2)	69 (97.2)
Negative	37 (92.5)	28 (52.8)	2 (2.8)
DNA chip			
Positive	8 (20.0)	22 (41.5)	64 (90.1)
Negative	32 (80.0)	31 (58.5)	7 (0.9)

ASCUS, Atypical squamous cells of undetermined significance; SCC, invasive squamous cell carcinoma.

Table 3. Odds ratio of high-risk HPV genotypes for cervical lesions

Assays results	Normal (n=40)	ASCUS (n=53)	Odds ratio (95%CI)	SCC (n=71)	Odds ratio (95%CI)
RFMP					
Positive	3	25	11.0	69	425.5
Negative	37	28	3.2-37.5	2	72.5-2444.8
DNA chip					
Positive	8	22	2.8	64	36.6
Negative	32	31	1.2-7.2	7	12.3-108.3

ASCUS, Atypical squamous cells of undetermined significance; SCC, invasive squamous cell carcinoma; CI, confidence interval.

원리를 이용하는 것이다(Fig. 1). HPV genotyping을 위해 HPV의 L1 표면 유전자 내 유전자형 결정 부위인 22 bp (nucleotide number 6604-6625)의 upstream이나 downstream에 *FokI* 제한효소 인지 부위가 포함된 프라이머를 제작하여 PCR하고 *FokI*과 *FokI*의 isoschizomer인 *BstF5I*로 연속 절단하면 상기 22 bp가 포함된 6개의 oligomer (7 mer, 12 mer, 13 mer 각 2조)가 도출된다.

주목할 만한 것은 이때 사용하는 제한효소는 type IIS 제한효소로서 인지 부위와 절단 부위가 다르다는 점이다. 즉 *FokI*은 인지 부위(GGATG)의 위쪽 DNA 가닥은 9 bp, 아래쪽 DNA 가닥은 13 bp, *BstF5I*은 인지 부위(GGATG)의 위쪽 DNA 가닥은 2 bp, 아래쪽 DNA 가닥은 0 bp down stream을 절단한다. 이와 같이 TypeIIS 제한효소 인지 부위를 사용함으로써 유전자형 결정 부위의 서열과 무관하게 다양한 유전자형에 공통적인 프라이머를 사용하는 것이 RFMP법의 특징이다. 이는 유전자형 종류에 따라 다양한 프라이머나 프로브를 사용하는 제한효소길이다형성(RFLP)법이나 DNA 교잡법(hybridization-based assays)과 구별되는 기술 요소다.

유전자형 결정 부위를 포함하는 oligomers의 질량을 HPV 유전자형별로 정리해본 결과 유전자형마다 독특한 질량 패턴을 보였으며 서로 중첩되는 유전자형이 나타나지 않았다(Table 1). 즉 고위험군(high risk) 15종(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52,

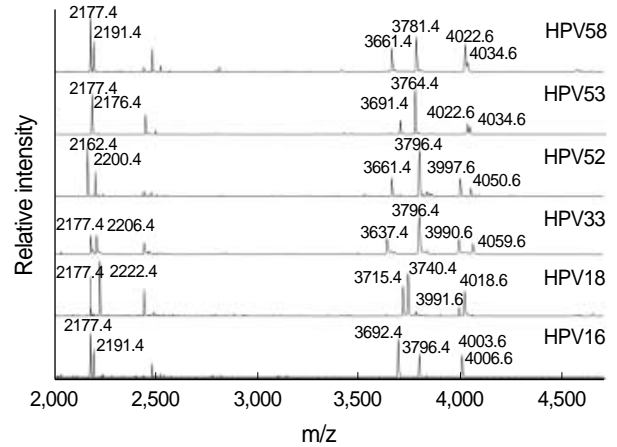


Fig. 2. Representative RFMP HPV genotyping results. RFMP results for high-risk group; HPV16, 18, 33, 52, 53, 58. X- and y- axes represent relative peak intensity and mass to charge ratio (m/z), respectively.

56, 58, 59, 67, 68, 69형), 중등도위험군(intermediate risk) 5종(26, 53, 66, 70, MM4형), 저위험군(low risk) 12종(6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 72, MM7), 미결정위험군(Unassigned risk) 9종(13, 30, 57, 62, 64, 74, 81[CP8304], 90, MM8) 등 총 41종의 HPV 유전자형을 분별할 수 있는 것으로 나타났으며, 유전형별 대표적인 질량 분석 스펙트럼은 Fig. 2와 같다.

세포진 검사에서 정상 소견을 보인 40명을 포함하여, 미확정 비정형 편평세포(ASCUS)의 상피세포 이상 소견을 보인 53명, 세포진 검사에서 양성 소견을 보인 후 질확대경 조준하에서 생검을 시행하여 자궁경부암으로 진단된 71명으로 구성된 총 164명의 검체를 대상으로 RFMP genotyping을 실시하였다. 그 결과 총 127예에서 HPV 유전자형이 검출되었으며, 이 중 97예가 고위험군 양성 HPV 유전자형으로 판정되었다. HPV 16형이 37.8% (48/127)의 빈도로 가장 흔한 유전자형이었고, HPV 58 (7.9%), 33 (5.5%), 18 (4.0%), 52 (4.0%)형의 순으로 빈발하였는데, 이들 상위 5개의 유전자형이 전체 HPV 양성 사례의 59.2%에 해당했다. HPV 양성 사례의 약 11%인 14예에서 2개 이상의 유전자형이 혼재되어 나타나는 중복 유전자형으로 판정되었는데, 13예가 2개 유전자형, 1예가 3개 유전자형이었다. 단일 유전자형과 마찬가지로 HPV 중복 유전자형 사례에서도 16형이 57.1% (8/14)로서 가장 많이 검출되었다.

세포 및 조직학적 소견별 RFMP법과 DNA chip을 이용한 HPV genotyping 결과

세포 및 조직학적 소견별로 HPV 고위험군에 대한 결과를 보면 정상군은 전체 40명 중 RFMP에서 양성 3명(7.5%), 음성 37명(92.5%)이었고 DNA chip에서는 양성 8명(20.0%), 음성 32명(80.0%)이었다. ASCUS 소견을 보인 그룹에서는 53명 중 RFMP에서 양성 25명(47.2%), 음성 28명(52.8%)이었고, DNA

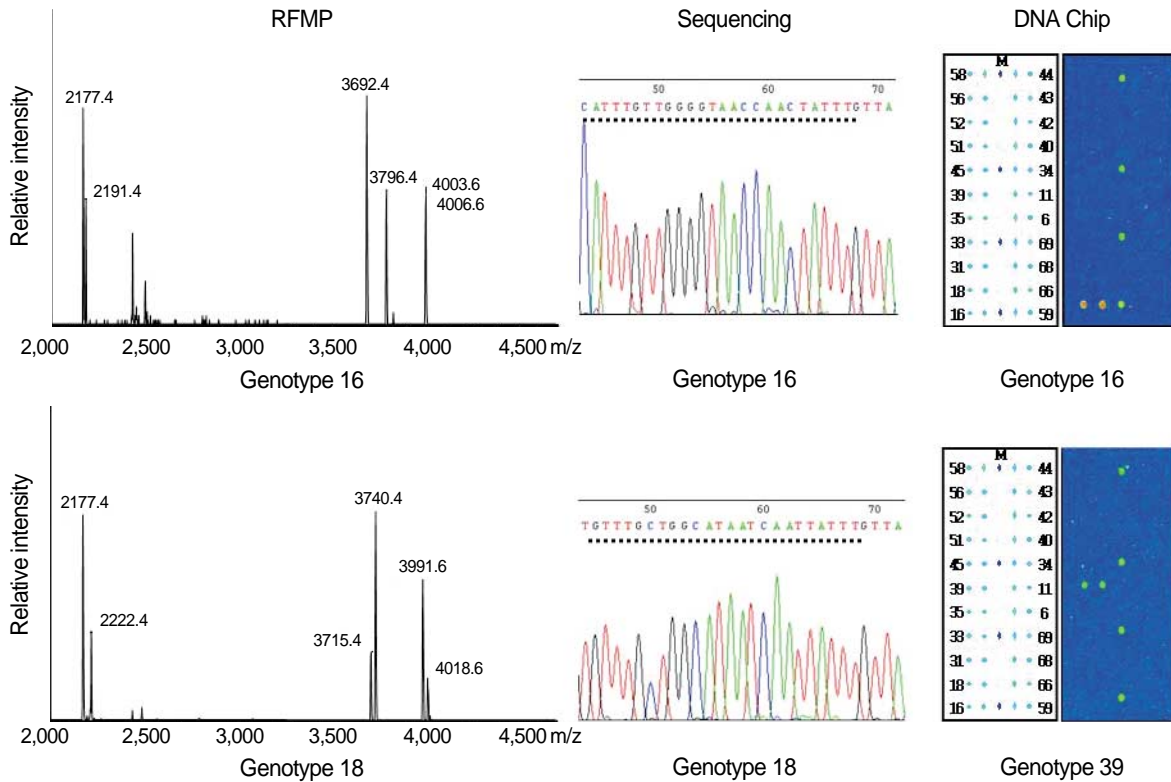


Fig. 3. Concordant and discordant results of HPV genotyping determined by RFMP and DNA chip assays. HPV genotype 16 identified by RFMP in Patient No. 2 with cervical carcinoma was shown to be genotype 16 by both DNA chip and direct sequencing (upper panel). HPV genotype 18 detected by RFMP in Patient No. 13 was found to be genotype 18 by direct sequencing but genotype 39 by DNA chip (low panel). Sequences in genotype-specific motifs were underlined in spectrogram of sequencing results.

chip에서는 양성 22명(41.5%), 음성 31명(58.5%)이었다. 침윤성 자궁경부암의 71예에서는 RFMP에서 양성 69명(97.2%), 음성 2명(2.8%)이었고, DNA chip에서는 양성 64명(90.1%), 음성 7명(0.9%)이었다. 이처럼 두 방법에서 모두 조직학적 병변의 악성도가 심할수록 HPV 고위험군에 높은 양성률을 보였다 (Table 2) ($p < 0.0001$).

HPV 고위험군 양성과 자궁경부 이상 소견의 로짓-회귀 분석에 따르면, HPV 고위험군 양성과 ASCUS 유병률의 Odds ratio (OR)는 RFMP법이 11 (95% CI: 3.2-37.5), DNA chip이 2.8 (95% CI: 1.2-7.2)이었고, HPV 고위험군 양성과 자궁경부암의 연관성은 RFMP법이 425.5 (95% CI: 72.5-244.8), DNA chip이 36.6 (95% CI: 12.3-108.3)로서 두 방법에서 모두 통계적인 유의성을 보였으나, RFMP법이 다소 우수한 것으로 나타났다.

RFMP법과 DNA chip 검사법간의 HPV 유전자형 일치율

RFMP법과 DNA chip 검사법에서 모두 HPV 고위험군 양성으로 분류된 예는 82명, 모두 음성인 예는 57명으로 전체 164예 중 139예가 일치하여 84.8%의 일치율을 보였다. 또 kappa 계수가 0.688 (95%CI, 0.0576-0.800; 표준오차, 0.057)로서 일치도도 상당히 의미 있게 높았다(Table 4, Fig. 3). RFMP법에

Table 4. Concordance rate between RFMP and DNA chip assays for HPV genotyping

Assays	Result, n (%)	DNA chip		Total
		Negative	Positive	
RFMP	Negative	57 (34.8)	10 (6.1)	67 (40.9)
	Positive	15 (9.1)	82 (50.0)	97 (59.1)
	Total	70 (42.7)	94 (57.3)	164

Kappa, 0.688 (95%CI, 0.576-0.800; standard error, 0.057).

서는 양성이나 DNA chip 검사법에서는 음성인 예를 보면, ASCUS가 7명, 자궁경부암이 8명이었다. RFMP법에서는 음성이나 DNA chip 검사법에서는 양성인 예는 정상 소견이 5명, ASCUS가 4명, 자궁경부암이 1명이었다. RFMP법과 DNA chip 검사법에서 모두 HPV 고위험군 양성으로 분류되었지만 유전자형 수준에서 차이가 있는 경우가 5예 있었는데, RFMP법에서는 16, 18, 39, 52, 58형이었고 DNA chip 검사법에서는 각각 39, 39, 68, 16, 59형으로서 특이한 경향성을 보이지는 않았다. 이 중 직접염기서열법이 가능했던 3예는 RFMP법 결과와 같은 결과를 보여 주었다(Fig. 3).

Table 5. Comparison of diagnostic accuracy between RFMP and DNA chip assays for HPV genotyping

Screening	Assays	Sensitivity (%) (95% CI)	Specificity (%) (95% CI)	PPV (%) (95% CI)	NPV (%) (95% CI)
SCC	RFMP	97.2 92.9-99.1	92.5 84.8-95.8	95.8 91.6-97.7	94.9 87.0-98.3
	DNA chip	90.1 84.3-94.1	80.0 69.7-87.1	88.9 83.1-92.8	82.1 71.5-89.3
ASCUS & SCC	RFMP	75.8 72.3-77.4	92.5 81.8-97.4	96.9 92.5-98.9	55.2 54.8-58.1
	DNA chip	69.4 65.3-72.3	80.0 67.3-89.0	91.5 86.1-95.3	45.7 38.5-50.9

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI, confidence interval.

RFMP법과 DNA chip 검사법의 진단 정확성 및 임상적 유용성 비교

침윤성 암 소견을 보인 경우를 양성으로 하여 분석했을 때, RFMP와 DNA chip 검사법의 민감도(sensitivity)는 각각 97.2%, 90.1%, 특이도(specificity)는 각각 92.5%, 80.0%, 양성예측도(positive predictive value, PPV)는 각각 95.8%, 88.9%, 음성예측도(negative predictive value, NPV)는 각각 94.9%, 82.1%였다. 침윤성 암을 포함한 ASCUS 전암병변 이상을 양성으로 간주할 때, RFMP와 DNA chip 검사법의 민감도는 각각 75.8%, 69.4%, 특이도는 각각 92.5%, 80.0%, 양성예측도(PPV)는 각각 96.9%, 91.5%, 음성예측도(NPV)는 각각 55.2%, 45.7%였다(Table 5).

고 찰

초기 자궁경부암과 전암성 병변(precancerous lesion)을 선별하는 검사인 자궁경부 세포진 검사는 1943년 Papanicolaou 등이 자궁경부암 진단에 처음으로 이용하였다. 그 후 시행의 편리성, 저비용 등의 장점 때문에 선별검사로 가장 널리 사용되고 있다.³ 하지만 자궁경부 세포를 채취하여 고정, 관독하는 과정에서 생기는 오류로 인한 6-55%의 높은 위음성률(false negative rate)이 문제로 제기되고 있다.²³

자궁경부암의 위험인자로는 성적 배우자의 숫자, 조기 성경험, 흡연, 감염 등이 제시되고 있다. 그렇지만 최근 분자생물학 기술을 이용한 여러 연구를 통해 자궁경부암 발생 과정에서 인유두종 바이러스(HPV)에 의한 감염이 핵심 역할을 한다는 사실이 입증되었다.¹ HPV 감염은 자궁경부 편평상피 내 병변의 주된 원인으로 편평상피 내 병변이 진행될수록 고위험 HPV의 양성률은 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 자궁경부 편평상피 내 병변과 자궁경부암을 진단, 치료하는 데 HPV 검사가 유용하다

고 판단되었다.

HPV DNA를 검사하는 방법으로는 미국식품의약국의 공인을 받은 HPV DNA hybrid capture II system이 있다. 이 방법을 이용한 HPV 검사의 유용성에 관한 연구가 보고되어 왔는데, 이 방법은 신속하고 정량이 가능하다는 장점이 있으나 감염된 바이러스가 고위험군에 속하는지 저위험군에 속하는지만 알 수 있고 각각의 유전자형은 판별할 수 없다는 단점이 있었다. 특히, hybrid capture법은 저위험군의 바이러스 유전자형이 고위험군 probe cocktail에 반응하는 교차 교잡 반응(cross-reactivity)이 문제점으로 수차례 지적된 바 있다.²⁴⁻²⁶ Peyton 등은 HC II probe cocktail이 HPV 53형을 비롯하여 66, 67, 73, CP6108 등과 비특이적 교잡반응을 보여 고위험군으로 판독될 수 있다고 보고하였으며,²⁴ Poljak 등도 HC 검사에서 고위험군 probe cocktail이 6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 61, 66, 70, 73, 81형 등의 고위험군이 아닌 유전자형이 고위험군으로 판독될 가능성이 있다고 보고한 바 있다.²⁵ 최근에 개발된 HPV DNA chip 검사는 PCR을 이용하여 매우 높은 민감도로 HPV 감염을 확인할 수 있고 각각의 유전자형과 중복감염(multiple infection)도 구분할 수 있는 유용한 검사로 알려져 있다. 그러나 연구자별, 병변의 진행 단계별로 특이도에 차이가 있고, 검사가 수작업으로 이루어지기 때문에 대규모 검체 처리에는 한계가 있었다.

말디토프 질량분석(MALDI-TOF MS)을 이용한 분석 시스템은 검출하고자 하는 분석자(analyte)의 고유 질량을 측정함으로써, 유전체학(genomics), 단백체학(proteomics), 진단(diagnostics) 분야 등 다양한 생물과학 분야에서 정확성이 높은 것으로 보고된 바 있다. MALDI-TOF MS를 이용한 유전자 분석 기법은 PCR 이후 더 이상 교잡 반응 과정 없이 MALDI-TOF 이온화 과정을 거쳐, DNA가 진공관에서 날아가는 속도 차이로 염기서열을 알아내는 것이다.

MALDI-TOF MS를 이용한 유전자 분석 기법으로 최근 개발된 RFMP법은 유전자 서열을 이루는 4개의 염기가 고유한 질량 값을 가진다는 점에 착안하여(A=331.2, C=307.2, G=347.2, T=322.2), 유전자 내 변이가 밀집한 부위(genotype-specific motifs)를 직접 절단해내고, 조각난 유전자 절편(genotype-diagnostic fragments)의 질량을 측정함으로써 유전자형을 파악하는 범용 기술로서, MALDI-TOF MS 분석의 특성상 정확도, 민감도, 대용량 처리능력 및 변이간 linkage 분석능력 등이 장점으로 알려져 있다. 또 복수의 유전자형을 진단할 때 바이러스의 혼합 감염을 정량적으로 진단할 수 있으므로, 그 임상적 응용성이 높아 간염 바이러스(HBV, HCV) 진단 분야에서 이미 차세대 유망 신기술로 평가되고 있다.¹³⁻¹⁹ RFMP법은 TypeIIIS 제한효소 인지 부위를 사용함으로써 유전자형 결정 부위의 서열과 무관하게 다양한 유전자형에 공통적인 프라이머를 사용한다. 이는 유전자형별로 다른 탐색자(probe)를 이용하는 DNA 교잡법(hybridization-based assays)과 구별되며, 유전자형 간 교차 교잡 반응이 원천적으로 배제되는 특징이 있다.

본 연구에서는 RFMP법으로 HPV genotyping assay는 고위험군(high risk) 15종(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 69 형), 중등도위험군(intermediate risk) 5종(26, 53, 66, 70, MM4 형), 저위험군(low risk) 12종(6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 72, MM7), 미결정위험군(Unassigned risk) 9종(13, 30, 57, 62, 64, 74, 81[CP8304], 90, MM8) 등 총 41종의 HPV 유전자형을 분별할 수 있는 것으로 나타났다. 정상군 40명, 미확정 비정형 편평세포(ASCUS) 소견의 53명, 침윤성 자궁경부암으로 진단된 71명으로 구성된 총 164명의 검체를 대상으로 한 검사 결과, 총 127예에서 HPV 유전자형이 검출되었으며, 이 중 97예가 고위험군 양성 HPV 유전자형으로 판정되었다. HPV 16형이 37.8% (48/127)의 빈도로서 가장 흔한 유전자형이었고, HPV 58 (7.9%), 33 (5.5%), 18 (4.0%), 52 (4.0%)형의 순으로 빈발하였는데, 이들 상위 5개의 유전자형이 전체 HPV 양성 사례의 59.2%에 해당했다.

WHO는 전 세계적으로 자궁경부암에 빈발하는 유전자형으로 순위별로 HPV 16, 18, 45, 31, 33형을 보고한 바 있으며, 한국, 중국, 싱가포르, 일본의 연구자들도 HPV 16, 18, 58, 52형 등을 자궁경부암 위험도를 높이는 보편적인 유전자형으로 지목한 바 있는데, 본 연구 결과의 유전자형 분포와 큰 차이가 없었다.^{11,12,27}

세포 및 조직학적 소견별로 HPV 고위험군에 대한 RFMP법과 DNA chip법의 결과를 비교해보면, 두 방법 공히 병변의 악성도가 심할수록 HPV 고위험군에 높은 양성률을 보였다(Table 2) ($p < 0.0001$). Solomon 등(2001)의 연구에 따르면, ASCUS 환자의 56.6%가 hybrid capture II 검사에 양성을 보였고 CIN 이상에 서는 민감도가 95.5%라고 하였다.²⁸ 본 연구에서 53명의 ASCUS 환자를 대상으로 검사를 시행한 결과, RFMP법 검사에서는 양성률이 47.2%, DNA chip 검사법에서는 양성률이 41.5%였다. 또 71명의 침윤성 암 환자를 대상으로 검사를 한 결과, RFMP법에서는 양성률이 97.2%, DNA chip 검사법 양성률이 90.1%로서 유사한 결과를 보였다. 따라서 ASCUS 세포진 검사에서 고위험 HPV 감염을 진단하는 것이 세포진 검사와 질확대경 검사의 중간단계 검사로서 자궁경부암으로 진행될 위험성이 높은 여성을 선별하는 데 유용하다는 점을 시사하였다.

한편 HPV 고위험군 양성과 자궁경부 이상 소견의 로짓-회귀 분석에 따르면, HPV 고위험군 양성과 ASCUS 유병률의 odds ratio (OR)는 RFMP법이 11 (95% CI: 3.2-37.5), DNA chip이 2.8 (95% CI: 1.2-7.2)이었고, HPV 고위험군 양성과 자궁경부암의 연관성은 RFMP법이 425.5 (95% CI: 72.5-244.8), DNA chip이 36.6 (95% CI: 12.3-108.3)로서 두 방법에서 모두 통계적으로 강한 유의성을 보였으나, RFMP법이 다소 우수한 것으로 나타났다.

RFMP법과 DNA chip 검사법에서 모두 HPV 고위험군 양성으로 판정된 환자가 82명, 모두 음성인 환자가 57명으로 전체 164예 중 139예가 일치하여 84.8%의 일치율을 보였다. 또 kappa 계수가 0.688 (95% CI, 0.0576-0.800; 표준오차, 0.057)로서 일

치도도 상당히 의미 있게 높았다(Table 4, Fig. 3). 침윤성 암 소견을 보인 예를 양성으로 판정하여 분석하였을 때, RFMP와 DNA chip 검사법의 민감도(sensitivity)는 각각 97.2%, 90.1%, 특이도(specificity)는 각각 92.5%, 80.0%, 양성예측도(PPV)는 각각 95.8%, 88.9%, 음성예측도(NPV)는 각각 94.9%, 82.1%였다. 침윤성 암을 포함한 ASCUS 전암병변 이상을 양성으로 간주할 때, RFMP와 DNA chip 검사법의 민감도는 각각 75.8%, 69.4%, 특이도는 각각 92.5%, 80.0%, 양성예측도는 각각 96.9%, 91.5%, 음성예측도는 각각 55.2%, 45.7%였다(Table 5). 저등급 자궁경부 병변이나 침윤성 암을 포함한 고등급 병변을 대상으로 한 기존의 연구 결과를 살펴보면, HBV DNA chip과 hybrid capture법에서 민감도는 각각 86.8-93.7%, 71.7-94.6%, 특이도는 34.7-89.5%, 71.4-81.3%이다. 즉 민감도 면에서는 HBV DNA chip 검사법이 hybrid capture법과 유사하거나 다소 우수하나, 특이도 면에서는 낮은 성적을 보이고 있다.^{11,12,29} 본 연구를 통해 RFMP법은 민감도와 양성예측도 면에서 DNA chip 검사법보다 다소 우수하거나 유사하며 특이도와 음성예측도 면에서는 DNA chip 검사법보다 진전된 성적을 보여주어, 전반적으로 자궁경부 병변의 진단 정확성을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로, 말디토프 질량분석을 토대로 개발된 RFMP HPV 유전자형 진단법은 40여 종에 이르는 폭넓은 유전자형을 분별할 수 있는 능력이 있으며, 중복 감염을 진단할 수 있다. 기존의 DNA chip 검사법과 비교해볼 때, 매우 높은 일치율을 보였고, 검사의 민감도와 특이도 면에서 정확도가 높았다. 따라서 RFMP법으로 HPV 유전자형을 결정하는 것은 매우 정확하며 대용량 자동화 분석도 쉽게 적용할 수 있으므로 임상 선별검사로서 유용한 방법이라 생각된다.

참고문헌

1. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, *et al*. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
2. Stephen AL, Thompson CH, Tattersall MH, Cossart YE, Rose BR. Analysis of mutations in the URR and E6/E7 oncogenes of HPV 16 cervical cancer isolates from central China. *Int J Cancer* 2000; 86: 695-701.
3. Chow VT, Loh E, Yeo WM, Tan SY, Chan R. Identification of multiple genital HPV types and sequence variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing. *Pathology* 2000; 32: 204-8.
4. Laconi S, Greco M, Pellegrini-Bettoli P, Rais M, Laconi E, Pani P. One-step detection and genotyping of human papillomavirus in cervical samples by reverse hybridization. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 200-6.
5. The atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade

- squamous intraepithelial lesions triage study (ALTS) group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 397-402.
6. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, *et al.* Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994; 169: 235-40.
 7. 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: 3020-7.
 8. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A general primer GP5+/6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 791-5.
 9. Wang SY, Liu WM, Wang TS, Chou HF, Choo KB. Typing of human papillomaviruses by reductional RFLP analysis of biotin-labeled PCR fragments. *Biotechniques* 1997; 23: 574-78.
 10. Feoli-Fonseca JC, Oigny LL, Brochu P, Simard P, Falconi S, Yotov WV. Human papillomavirus (HPV) study of 691 pathological specimens from Quebec by PCR-direct sequencing approach. *J Med Virol* 2001; 63: 284-92.
 11. Choi BS, Kim O, Park MS, Kim KS, Jeong JK, Lee JS. Genital human papillomavirus genotyping by HPV oligonucleotide microarray in Korean commercial sex workers. *J Med Virol* 2003; 71: 440-5.
 12. Kim CJ, Jeong JK, Park M, *et al.* HPV oligonucleotide microarray-based detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesions. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 210-7.
 13. Cook L, Jerome KR. Mass spectrometry for genotyping hepatitis C virus: a promising new approach. *Clin Chem* 2005; 51: 1091-2.
 14. Lee CH, Kim SO, Byun KS, *et al.* Predominance of hepatitis B virus YMDD mutants is prognostic of viral DNA breakthrough. *Gastroenterology* 2006; 130: 1144-52.
 15. Lee YS, Suh DJ, Lim YS, *et al.* Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy. *Hepatology* 2006; 43: 1385-91.
 16. Paik YH, Han KH, Hong SP, *et al.* Clinical impact of early detection for YMDD mutant on the outcomes of long-term lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2006; 11: 447-55.
 17. Kim HS, Han KH, Ahn SH, *et al.* Evaluation of methods for monitoring drug resistance in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy based on mass spectrometry and reverse hybridization. *Antivir Ther* 2005; 10: 441-9.
 18. Kim YJ, Kim SO, Chung HJ, *et al.* Population genotyping of hepatitis C virus by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of short DNA fragments. *Clin Chem* 2005; 51: 1123-31.
 19. Hong SP, Kim NK, Hwang SG, *et al.* Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol* 2004; 40: 837-44.
 20. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-8.
 21. Gravitt E, Peyton CL, Alessi TQ, *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 357-61.
 22. Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 403-5.
 23. Soost HJ, Lange HJ, Lehmacher W, Ruffing-Kullmann B. The validation of cervical cytology. Sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Cytol* 1991; 35: 8-14.
 24. Peyton CL, Schiffman M, Lorincz AT, *et al.* Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3248-54.
 25. Poljak M, Marin IJ, Seme K, Vince A. Hybrid Capture II HPV Test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J Clin Virol* 2002; 25: S89-97.
 26. Terry G, Ho L, Londesborough P, Cuzick J, Mielzynska-Lohnas I, Lorincz A. Detection of high-risk HPV types by the hybrid Capture 2 test. *J Med Virol* 2001; 65: 155-62.
 27. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19: 1-5.
 28. Solomon D, Schiffman M, Tarone R, ALTS Study group. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: Baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 293-9.
 29. Lorincz AT, Richart RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 959-68.