

Nachweis und Differenzierung von Humanen Papillomviren der Typen 6, 11, 16, 18 und 33 in Cervix-Abstrichen mittels PCR

PCR detection of human papillomavirus types 6, 11, 16, 18 and 33 in cytological samples

Marina Steinke, Ursula Geissler¹, S. Gehrish, W. Jaross

Zusammenfassung

Es wird eine Methode zum Nachweis und zur Differenzierung von HPV für Cervixabstriche dargestellt.

Der DNA-Schnellaufschluß erfolgte mittels eines nichtionischen Detergenzienpuffers und Proteinase K. Für die PCR wurden HPV-Konsensusprimer und typenspezifische HPV-Primer für die Typen HPV 6, 11, 16, 18 und 33 eingesetzt.

Der neu eingeführte HPV 16 5'-Primer MS 18 5'-TCTCGGCATTACTGCCCATCC führte zu verbesserten Amplifikaten (in Kombination mit dem 3'-Primer 16-2 nach Van den Brule [1]). Zur Qualitätssicherung wurden in der PCR Positivkontrollen und Negativkontrollen, sowie β -Globin-Primer als interner Standard mitgeführt. Alle HPV 16 positiven Proben wurden zusätzlich mit den Restriktionsendonukleasen Mun I und Mse I geschnitten und sequenziert (Einzelstrang – Festphasen – Sequenzierung mit M-280-Streptavidin Dynabeads und dem T7-Terminator-Kit auf dem automatischen Sequencer 373A).

Die Methode wurde an 50 Cervixabstrichen von Patientinnen mit zytologischem Verdacht auf Cervicale Intraepitheliale Neoplasie (CIN) im Alter von

21–77 Jahren validiert. Mit den HPV-Konsensus-Primern waren 40 Patientinnen HPV positiv. 32 Abstriche waren in der PCR mit typenspezifischen Primern HPV positiv. 75 % davon waren mit HPV 16 infiziert.

Zwei der sechs Patientinnen ohne histologische Atypien waren in der PCR HPV positiv. Die Gruppen CIN I, II und CIN III zeigten einen vergleichbaren Prozentsatz an HPV-Positiven in der PCR (67 % bzw. 59 %). Bei Karzinompatientinnen wurde in jedem Fall eine HPV-Infektion nachgewiesen.

Schlüsselwörter

HPV – PCR

Summary

A routine method for the detection and typing of HPV in cervical smears is described.

DNA was extracted by heating the samples in PCR buffer with nonionic detergents and proteinase K. Consensus primers and type-specific primers were used for diagnostic analysis of HPV 6, 11, 16, 18 and 33. A newly designed upper HPV 16 primer was used for improved detection of HPV 16:

5'-TCTCGGCATTACTGCCCATCC (in combination with the lower primer 16-2 as described by Van den Brule et al.) [1]. We used β -globin primers as an internal standard to control the quality of the DNA preparation. In addition, the specificity of HPV 16 PCR products in positive samples was characterized by digestion with restriction endonucleases Mun I and Mse I. Samples with questionable PCR products were sequenced with a solid-phase sequencing procedure using T7 dye-terminators and magnetic beads on the Sequencer 373A.

Anschriften der Autoren:

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, ¹ Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden

Korrespondenz-Adresse:

Dr. med. Marina Steinke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Fetscherstr. 74, D-01307 Dresden

50 patients with CIN were examined for HPV 6, 11, 16, 18 and 33 with PCR before conization. HPV positive results with type-specific primers were obtained in 32 patients. 75 % of them were HPV 16 positive. Positive results with HPV consensus primers were found in 40 patients.

In patients with normal cervical histology, the HPV detection rate with PCR was 2 out of 6 (33 %). In patients with CIN a higher prevalence of HPV rate was found (67 % in CIN I, II and 59 % in CIN III). All patients with carcinomas were HPV positive.

Key words

HPV – PCR

Einleitung

Humane Papillomviren (HPV) befallen Haut und Schleimhäute und induzieren Warzen, Kondylome und intraepitheliale Neoplasien. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind über 60 Genotypen bekannt und 24 aus dem Genitalbereich isoliert worden [2, 3]. Die Typen HPV 16, 18 und 33 zeichnen sich durch häufiges Auftreten in anogenitalen Karzinomen aus.

Da die Vermehrung von Papillomviren *in vitro* nicht möglich ist, stellt der molekularbiologische Nachweis eine attraktive Methode zur Typisierung von HPV dar.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine potentiell geeignete Methode für den Nachweis und die Typisierung von HPV. Ziel dieser Arbeit war es, eine praktikable Methode zum Nachweis und zur Differenzierung von HPV zu erarbeiten und diese an 50 Cervixabstrichen von Patientinnen mit zytologischem Verdacht auf eine CIN zu validieren. Außerdem sollte geprüft werden, ob Zusammenhänge zwischen den histologischen Befunden und dem Nachweis von HPV bestehen.

Material und Methoden

50 Cervixabstriche von 50 stationären Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Carl Gustav

Carus der TU Dresden mit zytologischem Verdacht auf CIN wurden vor Konisation in der PCR auf HPV 6, 11, 16, 18 und 33 untersucht.

Die Abstriche wurden mit einem Wattetupfer entnommen, welcher 24 h bei +4 °C in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung inkubiert wurde. Nach kräftigem Vortexen und Entfernung des Tupfers folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4000 U/min. Nach Dekantierung des Überstandes stand die verbleibende Zellsuspension für einen Schnellaufschluß der DNA zur Verfügung:

50 µl Suspension, 500 µl nichtionischer Detergenzienpuffer (enthält Triton X100 und Tween 20) und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurden 2 h bei 56 °C inkubiert, 10 min gekocht, um die Proteinase K zu inaktivieren und schnell abgekühlt.

10 µl dieses Schnellaufschlusses kamen in der PCR zum Einsatz. Die Messung des DNA-Gehalts des Schnellaufschlusses erfolgte fluorometrisch mit dem Hoechst-Fluoreszenz-Farbstoff H 33258 auf dem Mini-Fluorometer TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco). Es schloß sich eine PCR (25 µl-Ansätze) in dem Thermal Cycler 9600 (Bodenseewerk Perkin Elmer GmbH, Überlingen) an. Die Endkonzentrationen im Ansatz betrugen 100 mM Tris/HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; je 0,2 nM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,25 % (v/v) Dimethylsulfoxid; je 0,4 µM Primer; 0,5 µg DNA; 2 Einheiten Taq-Polymerase (Beckman Instruments GmbH, München).

Wir verwendeten folgende PCR-Profile:

für die L1-HPV-Konsensus-Primer:

94 °C, 30 s;

53 °C, 45 s;

72 °C, 1 min; 40 Zyklen

für die typenspezifischen HPV-Primer:

94 °C, 30 s;

55 °C, 45 s;

72 °C, 1 min; 40 Zyklen

Für die PCR verwendeten wir die HPV L1 Konsensus-Primer MY09 und MY11 nach Manos [4] und die typenspezifischen HPV-Primer 6-1 und 6-2 für HPV 6, 11-1 und 11-2 für HPV 11, 16-1 und 16-2 für HPV 16, 18-1 und 18-2 für HPV 18, und 33-1 und 33-2 für HPV 33 nach Van den Brule [5] (Tabelle 1). Für die Synthese der Primer kam der Gene Assembler Plus (Pharmacia LKB GmbH, Freiburg) zum Einsatz.

Bei jeder PCR führten wir Positivkontrollen und Negativkontrollen (Mastermix + Wasser und genomische DNA) mit. Als Positivkontrolle für HPV 16 verwendeten wir CaSki-Zellen (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Diese Zelllinie enthält mehr als 500 Kopien HPV 16 pro Zelle [6]. Als Positivkontrolle für HPV 18 verwendeten wir HeLa-

Abkürzungen:

HPV = Humane Papillomviren

CIN = Cervicale Intraepitheliale Neoplasie

Zellen (American Type Culture Collection, Rockville, MD). HeLa-Zellen enthalten 10–50 Kopien HPV 18 pro Zelle [6].

Als internen Standard verwendeten wir β -Globin-Primer nach Saiki [7] in 2 verschiedenen Kombinationen in Abhängigkeit von der Länge des HPV-PCR-Produktes: die Primer PCO₃ und PCO₄ mit einem Produkt von 110 bp und die Primer PCO₄ und GH₂₀ mit einem Produkt von 268 bp. Die β -Globin-Primer wurden gemeinsam mit den entsprechenden HPV-Primern in einem Ansatz eingesetzt.

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 2%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid geprüft und unter UV-Licht mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

Alle HPV 16-positiven Proben wurden mit den Restriktionsendonukleasen Mun I (Fermentas, Vilnius) und Mse I (New England BioLabs GmbH, Beverly, MA) geschnitten (Elektrophorese in 3% NuSieve-Gel) und außerdem sequenziert (Festphasen-Einzelstrang-DNA-Sequenzierung unter Verwendung des T7-Terminator-Kits (Applied Biosystems GmbH) und M-280 Streptavidin-Dynabeads (Dynal, Hamburg) auf dem automatischen Sequenzer 373A (Applied Biosystems GmbH).

Für die Sequenzierung wurde eine 50 μ l-PCR unter Verwendung eines biotinylierten HPV 16-2-Primers und eines unmodifizierten MS18-Primers durchgeführt.

Die Einzelstrangpräparation erfolgte entsprechend der Arbeitsvorschrift der Firma Dynal. 20 μ l M-280 Streptavidin-Dynabeads (10 μ g/ml) wurden einmal mit 20 μ l B&W-Puffer (Bindungs & Waschpuffer) gewaschen und in 40 μ l B&W-Puffer resuspendiert. Zur Einzelstrangpräparation wurden 40 μ l PCR-Produkt und 40 μ l Dynabeads unter ständigem Schütteln 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes und einmaligem Waschen mit B&W-Puffer wurden die Dynabeads in 10 μ l 0,1M NaOH resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, einmal mit 0,15M NaOH, einmal mit B&W-Puffer und einmal mit TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) gewaschen und in 14 μ l dest. Wasser resuspendiert.

Die Sequenzierung erfolgte entsprechend der Arbeitsvorschrift der Firma Applied Biosystems GmbH als Ein-Topf-Reaktion. Der an den Dynabeads gebundene und in 14 μ l Wasser resuspendierte Einzelstrang wurde zusammen mit 5 μ l 5 $\times$ ss MOPS-Puffer und 1 μ l Sequenzierprimer 2 min bei 80 °C inkubiert und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Zugabe von 4 μ l T7 Terminator-Mix und zweiminütiger Inkubation bei 37 °C folgten das Zupipettieren von 1 μ l T7 DNA-Polymerase (1,5 U/ μ l) und eine zehnminütige Inkubation bei 37 °C, danach wurden die Proben auf Eis gestellt. Die Abtrennung der überschüssigen Farbstoffe erfolgte

anstelle der aufwendigen Phenol-Chloroform-Extraktion durch viermaliges Waschen der Dynabeads mit dest. Wasser. Nach Resuspendierung der Beads in 8 μ l Formamid/50 mM EDTA (pH 8,0) (5:1 v/v) und 2 min Denaturierung bei 90 °C wurden 4 μ l der Probe auf dem automatischen Sequenzer 373A sequenziert.

Ergebnisse

Nach Schnellisolation der DNA aus Cervixabstrichen konnten durch Einsatz von Konsensusprimern bzw. typenspezifischen HPV-Primern gut auswertbare PCR-Produkte erhalten werden. Mit dem neu konstruierten HPV 16-Primer MS18 konnten stärkere PCR-Produkte im Vergleich zu den von Van den Brule et al. [5] beschriebenen HPV 16-Primern amplifiziert werden. Tabelle 1 enthält die von uns verwendeten Primer und die Länge der amplifizierten Produkte.

Tabelle 1. Primer

Primer	Sequenz	Produktlänge (bp)
6-1	+5'TAGTGGGCCTATGGCTCGTC3'	
6-2	-5'TCCATTAGCCTCCACGGGTG3'	280
11-1	+5'GGAATACATGCGCCATGTGG3'	
11-2	-5'CGAGCAGACGTCGCTCCTCG3'	360
16-1	+5'TGCTAGTGCTTATGCAGCAA3'	
16-2	-5'ATTTACTGCAACATTGGTAC3'	152
MS18	+5'TGTGGGCATTAGTGGCCATCC3'	202
18-1	+5'AAGGATGCTGCACCGGCTGA3'	
18-2	-5'CACGCACACGCTTGGCAGGT3'	216
33-1	+5'ATGATAGATGATGTAACGCC3'	
33-2	-5'GCACACTCCATGCGTATCAG3'	455
PCO ₃	+5'ACACAACCTGTGTTCACTAGC3'	110
PCO ₄	-5'CAACTTCATCCACGTTACCC3'	
GH ₂₀	+5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3'	268
MY11	+5'GCMCAGGGWCATAAAYATGG3'	
MY09	-5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3'	
M = A+C, R = A+G, W = A+T, Y = C+T		
HPV 6, 11, 33		448
HPV 16		451
HPV 18		454

Der fluorometrisch bestimmte DNA-Gehalt der Schnellisolationen betrug 8 bis 105 μ g/ml. DNA konnte aus allen Abstrichen isoliert werden. Alle HPV 16 positiven PCR-Produkte ließen sich mit den Restriktionsendonukleasen Mse I und Mun I schneiden und zeigten in der Sequenzierung volle Übereinstimmung mit der in der HPV-Datenbank vorgegebenen DNA-Sequenz (Abb. 1, 2).

Von 50 Patientinnen mit zytologischem Verdacht auf CIN wurde bei 40 Patientinnen in der PCR mit

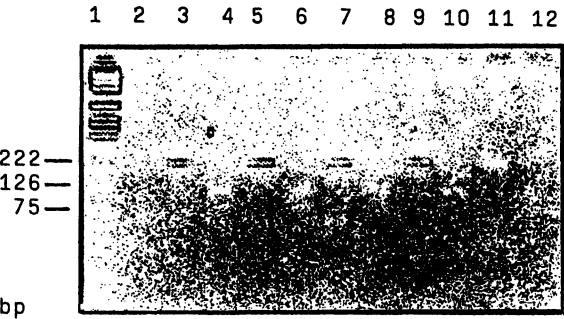


Abb. 1. PCR-Produkte von HPV 16 im 3 % NuSieve-Gel mit Ethidiumbromid. Spuren 5, 7, 9, 11: ungeschnitten – 202 bp; Spuren 4, 6, 8, 10, 12: mit Mse I geschnitten – 131 bp + 71 bp; Spur 3: CaSki-Zellen; Spur 2: Mastermix + H₂O; Spur 1: pGEM-Marker G1741 (Promega)

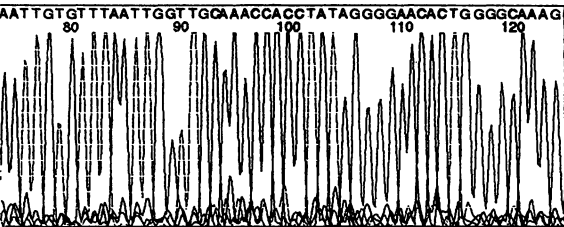


Abb. 2. Nucleotid-Sequenz 6100-6150 von HPV 16 (Festphasen-Einzelstrang-Sequenzierung von HPV 16 auf dem automatischen Sequenzer 373A (Applied Biosystems GmbH))

HPV-Konsensusprimern und bei 32 Patientinnen (64 %) mit typenspezifischen Primern ein positiver HPV-Befund (Infektion mit HPV 6, 11, 16, 18, 33 oder Doppelinfektionen) erzielt. Die Verteilung der HPV-Typen ergab folgendes Bild: 24 Patientinnen waren mit HPV 16 infiziert (das entspricht 75 % der HPV-positiven Patientinnen). Die anderen nachgewiesenen HPV-Typen kamen seltener vor: 6 mal HPV 33, 3 mal HPV 18, 2 mal HPV 11, 1 mal HPV 6 (Tabelle 2).

Tabelle 2. HPV Typenverteilung und Doppelinfektionen

	n
Patienten	50
HPV positiv mit Konsensus-Primern	40
HPV positiv mit typenspezifischen Primern	32
HPV 16	24 (75 %)
HPV 33	6 (19 %)
HPV 18	3 (9 %)
HPV 11	2 (6 %)
HPV 6	1 (3 %)
Doppelinfektionen	4

Wir fanden 4 Patientinnen mit einer HPV-Doppelinfektion (1× HPV 16 + HPV 6, 1× HPV 16 + HPV 11, 1× HPV 16 + HPV 18, 1× HPV 16 + HPV 33). In Tabelle 3 werden die histologischen Befunde mit den Ergebnissen der PCR verglichen. Es wird deutlich, daß gesicherte Karzinome (Ia und Ib) in jedem Fall HPV positiv waren, Patientinnen mit Cervicaler Intraepithelialer Neoplasie (CIN I, II, III) waren zu ca. 2/3 mit HPV infiziert, während Patientinnen ohne Atypien nur in ca. 1/3 der Fälle eine HPV-Infektion aufwiesen.

Tabelle 3. HPV-Nachweis und Typisierung in Abhängigkeit von der Histologie

Histologischer Typ	Zahl der Fälle	HPV-positiv	HPV-Typ (n)
keine Atypien	6	2 (33 %)	16(1) 18(1)
CIN I, II	15	10 (67 %)	11(1) 16(8) 18(1) 33(2)
CIN III	22	13 (59 %)	6(1) 16(10) 18(1) 33(3)
Ia	3	3 (100 %)	16(3)
Ib	3	3 (100 %)	16(2) 33(1)
Keine Histologie	1	1	11(1)

Diskussion

Nach unseren Erfahrungen eignen sich Schnellpräparationen, um bei begrenztem Material ausreichende, sequenzierbare DNA-Mengen zu gewinnen. Die von uns verwendete Methode zum Schnellaufschluß der DNA aus Cervixabstrichen mit einem nichtionischen Detergenzienpuffer und Proteinase K ist gegenüber der klassischen Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion schneller und methodisch weniger aufwendig. Wir konnten in den Schnellaufschlüssen fluorometrisch einen DNA-Gehalt von durchschnittlich 50 µg/ml bestimmen. Die fluorometrische Bestimmung sollte sichern, daß eine Mindestmenge DNA vorhanden war. Die PCR mit β-Globin-Primern war immer möglich. Wichtig ist die 24stündige Inkubation der Abstriche, um eine maximale Zellablösung von den Wattetupfern zu erreichen.

Da bei der Schnellisolierung ein Umpipettieren der Phasen nicht erforderlich ist, wird die Gefahr des Verlustes extrem kleiner DNA-Mengen minimiert. Der Nachteil der Schnellisolationsmethode besteht in der kürzeren Haltbarkeit der DNA im Vergleich zu Phenol-Chloroform-Extraktionen. Nach einem Jahr

Lagerung der Schnellpräparationen bei 4 °C waren Papillomviren in nur noch 50 % der HPV-positiven Proben nachweisbar.

Die von uns verwendeten HPV-Konsensus-Primer MY09 und MY11 [4] ergaben in der PCR stärkere Amplifikate als die von Van den Brule [5] verwendeten Konsensus-Primer CP5 und CP6, was mit den Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmt [8]. Die typenspezifischen HPV-Primer verwendeten wir nach Van den Brule [1], mit Ausnahme des Primers MS18 anstelle des Primers HPV 16-1, womit wir verbesserte Amplifikate erhielten. Die typenspezifischen HPV-Primer nach Van den Brule sind so ausgewählt, daß die Produktlängen unterschiedlich sind und so alle Primer in einer PCR eingesetzt werden können [1]. Die drei verwendeten β -Globin-Primer [3] wurden in zwei Kombinationen verwendet, so daß das PCR-Produkt sich gut vom HPV-Produkt in der Elektrophorese unterschied (PCO₃ und PCO₄-110 bp: GH₂₀ und PCO₄-268 bp). Das HPV 16 PCR-Produkt (biotinylierter HPV 16-2 und MS18) ließ sich gut sequenzieren. Als Sequenzierprimer eigneten sich MS18 und 16-1 gleich gut.

Die von uns gefundenen Ergebnisse beim Nachweis von HPV in 50 Cervix-Abstrichen von Patientinnen mit zytologischem Verdacht auf CIN stimmen gut mit den Ergebnissen anderer Autoren überein [1, 9].

Mit den HPV-Konsensus-Primern waren 40 Patientinnen positiv, wogegen bei nur 32 Patientinnen mit typenspezifischen Primern eine Infektion mit HPV 6, 11, 16, 18 oder 33 nachgewiesen werden konnte. Nach Schiffmann et al. [10] werden mit den HPV-Konsensus-Primern MY09 und MY11 die Typen HPV 5, 6, 8, 11, 16, 18, 26, 27, 30, 31, 33, 35, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 58 und 59 erfaßt. In einem Fall erhielten wir mit den HPV-Konsensus-Primern kein PCR-Produkt, obwohl wiederholt der Nachweis von HPV 16 mit typenspezifischen Primern gelang. Von Tucker et al. wird beschrieben, daß große Mengen an genomischer DNA zu einer erschwerten Anlagerung besonders von Konsensus-Primern an die Ziel-DNA führen [11]. Außerdem kommt es zur Verfälschung der Ergebnisse bei Infektionen mit mehreren HPV-Typen.

Zahlreiche Autoren haben bei hohen Nachweisraten von HPV Probleme durch Kontaminationen. In unserem Labor führten wir eine strikte räumliche Trennung zwischen Probenvorbereitung und Amplifikation/Detektion durch. Wir verwendeten keine Plasmide, alle HPV-16 positiven Proben wurden mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und sequenziert. Die direkte Sequenzierung PCR-amplifizierter DNA liefert den endgültigen Beweis für den nachgewiesenen HPV-Typ. Die Gruppen CIN I, II und CIN III zeigten einen vergleichbaren Prozentsatz an

HPV-Positiven in der PCR (67 % bzw. 59 %). Patientinnen mit gesicherten Karzinomen waren in jedem Fall HPV positiv. Mit zunehmender Malignisierung war ein höherer Prozentsatz von HPV-Infektionen nachweisbar.

Die Korrelation der Malignität eines Karzinoms mit der HPV-Infektionsrate ist umstritten. Von Bedeutung hierfür scheinen Infektionen mit solchen Papillomviren zu sein, welche Brüche in bestimmten Regionen aufweisen, z. B. in der E2-Region [12, 13], wodurch eine Integrierung in das Genom ermöglicht wird. Zwei der sechs Patientinnen ohne histologische Atypien zeigten in der PCR einen positiven HPV-Befund. Hierbei könnte es sich um frische Infektionen handeln, die noch keine histologischen Veränderungen hervorgerufen haben. Viele Autoren verzeichnen eine hohe Nachweisrate insbesondere von HPV 16 bei zytologisch unauffälligen Frauen [9]. Der alleinige Nachweis von HPV 16-DNA ist als Malignitätsmarker nur eingeschränkt verwendbar. Therapeutische Konsequenzen werden nach wie vor nach zytologischen, histologischen und kolposkopischen Befunden gezogen.

Literatur

1. Van den Brule AJC, Claus ECJ, du Maine M, Melchers WJG, Helmerhorst T, Quint WGV, Lindeman J, Meijer CJLM, Walboomers JMM (1989) Use of anticontamination primers in the polymerase chain reaction for the detection of human papilloma virus genotypes in cervical scrapes and biopsies. *J. Med. Virol.* 29, 20–27
2. De Villiers EM (1989) Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J. Virol.* 63, 4898–4903
3. Seedorf K, Krämmner G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp WG (1985) Human Papillomavirus Typy 16 DNA Sequence *Virology* 145, 181–185
4. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989) The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7, 209–214
5. Van den Brule AJC, Meijer CJLM, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JMM (1990) Rapid Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer – mediated and type – specific polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2739–2743
6. Snijders PJF, van den Brule AJC, Schrijnemakers HFJ, Snow G, Meijer CJLM, Walboomers JMM (1990) The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* 71, 173–181
7. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986) Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324, 163–166

8. Sinclair AL, Nouri AME, Oliver RTD, Sexton C, Dagleish AG (1993) Bladder and prostate cancer screening for human papillomavirus by polymerase chain reaction: conflicting results using different annealing temperatures. *Br. J. Biomed. Sci.* 50, 350–354
9. Melchers WJG, Claas HJ, Quint WGV (1991) Use of the polymerase chain reaction to study the relationship between human papillomavirus infections and cervical cancer. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 714–727
10. Schiffmann MH, Bauer HM, Lorincz AT, Manos MM, Byrne JC, Glass AG, Cadell DM, Howley PM (1991) Comparison of Southern blot hybridisation and polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus DNA. *J. Clin. Microbiol.* 29, 572–577
11. Tucker RA, Johnson PR, Reeves WC, Icenogle JP (1993) Using the polymerase chain reaction to genotype human papillomavirus DNAs in samples containing multiple HPVs may produce inaccurate results. *J. Virol. Methods* 43, 321–334
12. El Awady MF, Kaplan JB, O'Brian SI, Burk RD (1987) Molecular analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology* 159, 389–398
13. Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G (1987) Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J. Virol.* 61, 3295–3298