

SİNYAL AMPLİFİKASYON TEKNİKLERİ VE TANISAL VİROLOJİDEKİ UYGULAMALARI

SIGNAL AMPLIFICATION TECHNIQUES AND APPLICATIONS IN DIAGNOSTIC VIROLOGY

Fatih ŞAHİNER¹ , Ramazan GÜMRAL¹ 

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ORCID IDs of the authors: F.Ş. 0000-0002-3488-0339; R.G. 0000-0002-2303-8234

Cite this article as: Sahiner F, Gumral R. Signal amplification techniques and applications in diagnostic virology. J Ist Faculty Med 2020;83(3):291-301. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0077

ÖZET

Tanısıl virolojide PCR dışı moleküler araçlar arasında ilk sırada sinyal amplifikasyon yöntemleri yer almaktadır. Sinyal amplifikasyon testlerinde klinik örneklerdeki hedef DNA veya RNA'nın doğrudan kopyalanması yerine, bu moleküllerden elde edilen sinyallerin yükseltilmesi ve ölçülmesi amaçlanır. Bu özellikleri ile sinyal amplifikasyon yöntemleri incelenecek örnekler, kullanılan gereçler veya çalışma ortamının amplifiye ürünlerle kontamine olması bakımından risk taşımazlar. HIV-1, HCV ve HPV nükleik asitlerinin saptanması ve kantitasyonu ve HPV genotip analizi için onaylı sinyal amplifikasyon testleri ticari olarak kullanıma sunulmuştur. İlk olarak 1990'lı yılların başlarında kullanılmaya başlanan ve farklı çalışma prensipleri ve özel tasarımlara sahip olan sinyal amplifikasyon testleri günümüzde real-time PCR, rolling circle yöntemi, luminex xMAP, DNA biyosensör teknolojisi ve dizi analizi gibi yeni tanısal tekniklerle kombine edilerek viral etkenlerin saptanması, genotiplendirilmesi, multipleks analizleri ve bilinmeyen yeni virüslerin keşfedilmesinde kullanılmaktadır. Onaylı sinyal amplifikasyon testleri yeni geliştirilen test tasarımları için standart kontrol yöntemleri olarak da kullanılmaktadır. Bu derlemede sinyal amplifikasyon temelli testlerin çalışma prensipleri ve tanısal virolojideki kullanımları detaylı olarak ele alınmış ve diğer platformlardaki kullanımlarına dair örnekler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Dalı DNA, Hibrid yakalama, İnvader

ABSTRACT

Signal amplification methods are the most preferred non-PCR molecular tools in diagnostic virology. The aim of signal amplification tests is to amplify and measure the signals obtained from the target DNA or RNA in clinical samples, instead of directly copying these molecules. With these characteristics, signal amplification methods do not pose any risk of contamination of the test samples, laboratory devices or working environment with amplified products. Approved signal amplification tests have been commercially available for detection and quantitation of HIV-1, HCV and HPV nucleic acids, as well as genotyping analysis of HPV. Signal amplification tests were first used in the early 1990s and have different working principles and special designs. These tests are now combined with new diagnostic techniques such as real-time PCR, the rolling circle method, luminex xMAP, DNA biosensor technology and sequence analysis, in the detection and genotyping of viral agents, multiplex analysis and the discovery of new and unknown viruses. In addition, approved signal amplification tests are used as the standard control methods for newly developed test designs. In this review, the working principles of signal amplification-based tests and their use in diagnostic virology are discussed in detail and examples of their use in other platforms are presented.

Keywords: Branched DNA, Hybrid capture, Invader

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: fsvirol@gmail.com

Başvuru/Submitted: 11.09.2019 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 04.10.2019 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 05.10.2019 • **Kabul/Accepted:** 10.10.2019 • **Online Yayın/Published Online:** 21.11.2019

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Enfeksiyonlar veya genetik hastalıklarla ilişkili nükleik asitler klinik materyallerde çoğu kez düşük kopya sayılarında bulunurlar (1). Bu hastalıkların tanısı ve takibi için ya da herhangi bir numunedeki nükleik asit varlığının saptanması ve kantitasyonu için amplifikasyon temelli yaklaşımlara gereksinim duyulur (1-3). Amplifikasyon yaklaşımları çalışma prensiplerine göre genel olarak üç farklı grupta incelenir; (i) doğrudan hedef nükleik asitlerin çoğaltıldığı yöntemler, (ii) hedef nükleik asitlere bağlanan problemlerin amplifiye edildiği yaklaşımlar ve (iii) hedef nükleik asitlerden üretilen sinyallerin amplifiye edilmesine dayalı teknikler (1, 4). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), loop-mediated amplifikasyon (LAMP), nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA) ve transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) teknikleri nükleik asit sekanslarının kopyalarını çoğaltmada kullanılan hedef amplifikasyon yöntemlerinden en yaygın kullanılanlarıdır (5, 6). Ligaz zincir reaksiyonu (LCR), Qb replikaz ve strand displacement amplifikasyon (SDA) teknikleri ise spesifik olarak hedef nükleik asit sekanslarına bağlanan problemlerin kopyalanması prensibiyle çalışan prob amplifikasyon yöntemleridir (1, 5, 7). Sinyal amplifikasyon tekniklerinde ise hedef nükleik asitlerin veya spesifik problemlerin çoğaltılması yerine, her bir hedef nükleik asitlerin sekansından üretilen sinyalin yükseltilmesi hedeflenir (1, 5). Bu amaçla ilk olarak nükleik asitlerin özgün problemlerle hibridizasyonu gerçekleştirilir ve sonrasında bu komplekslerden elde edilen sinyalin derecesi artırılır (1).

Literatürde tanımlanmış olan sinyal amplifikasyon tekniklerinin en önemlileri; dallı DNA (bDNA; dallanmış DNA veya branched DNA), döngüsel prob (CP; cycling probe), hibrid yakalama (HC; hybrid capture), Invader yöntemi ve tiramid sinyal amplifikasyonu (TSA) teknikleridir (Tablo 1)

(1, 8). Son yıllarda bu tekniklere nanopartiküllerin kullanıldığı yeni sinyal amplifikasyon yöntemleri de eklenmiştir (9). Klinik örneklerde HIV (*human immunodeficiency virus*), HBV (*hepatitis B virus*), HCV (*hepatitis C virus*), CMV (*human cytomegalovirus*) ve HPV (*human papillomavirus*) varlığının saptanması ve kantitasyonu için geliştirilmiş ve ticari olarak kullanıma sunulmuş çeşitli sinyal amplifikasyon testleri bulunmaktadır (1). Sinyal amplifikasyon yaklaşımı ayrıca, mRNA kantitasyonu, bakteriyel antibiyotik direnç genlerinin gösterilmesi ve genetik hastalıkların tanısı (faktör V Leiden, kistik fibrozis ve Tay-Sachs tanısı, tek nükleotid polimorfizmlerinin saptanması) için de kullanılmıştır (1).

Günümüzde viral nükleik asitlerin amplifikasyonu ve kantitasyonunda geniş dinamik aralıkları ve üstün saptama duyarlılıkları ile real-time PCR temelli testler rutin viroloji laboratuvarlarında en sık kullanılan testler haline gelmiştir (2). FDA (Food and Drug Administration, ABD) onaylı viral yük testlerin önemli bir bölümü yine real-time PCR temelli testler iken, onay alan diğer testler arasında TMA ve NASBA gibi izotermal amplifikasyon yöntemleri ve ayrıca bDNA, HC ve Invader gibi sinyal amplifikasyon testleri bulunmaktadır (10, 11). HPV, HIV-1 ve HCV tanısı için geliştirilmiş FDA onaylı sinyal amplifikasyon testleri belirli avantajlarıyla rutin tanıda tercih edilebildiği gibi, yeni geliştirilen tanı tarama testleri için karşılaştırmalı analizlerde standart kontrol testleri olarak da kullanılmaktadırlar (11, 12).

Branched (Dallı) DNA tekniği

Bu yöntem hedef nükleik asitlerin immobilize edilmesi ve takiben çok sayıda dallı ve işaretli problemler ile ardışık veya simultane hibridizasyonu sonrasında üretilen sinyalin ölçülmesi prensibi ile çalışır (8). Test genel olarak tamam-

Tablo 1: Sinyal amplifikasyon tekniklerine genel bakış (1,4,11).

Teknikler	Teorik amplifikasyon	Ticari formlar	Uygulamalar alanları
Dallı DNA (Branched DNA)	11.564 kat	Chiron, Bayer Healthcare Diagnostics Division (ABD).	HIV-1, HBV, HCV ve CMV viral yüklerinin saptanması; sitokin mRNA kantitasyonu; HIV-1 ve HPV'nin <i>in situ</i> saptanması.
Döngüsel prob (Cycling Probe)	Birbirinden farklı büyütmeler	ID Biomedical (Canada), Excimus Biotech (ABD)	Bakterilerde antibiyotik direnci saptanması; Mycobacterium tuberculosis'de direkt tekrarların karakterizasyonu. PCR ile kombine edildiği uygulamalar var.
Hibrit Yakalama (Hybrid Capture)	3000 kat	Digene Corporation (ABD)	HBV ve CMV viral yük kantitasyonu; HPV, Neisseria gonorrhoeae ve Chlamydia trachomatis saptanması.
Invader	10 ⁶ -10 ⁷ kat	Third Wave Technologies (ABD)	Genetik hastalıkların tanısı; SNP* analizi; HPV tanısı, HPV genotip tayini.
Tiramid Sinyal Amplifikasyonu	500-1000 kat	Molecular Probes (ABD)	HPV, HIV, 16S ribozomal RNA ve antimikrobiyal direnç genlerinin saptanması.

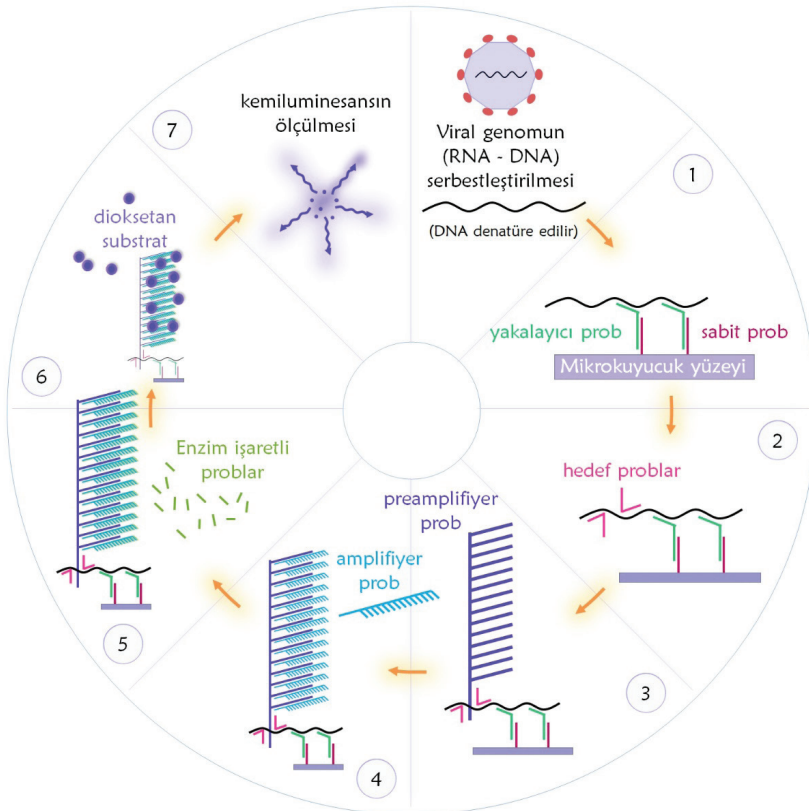
*SNP; single nucleotide polymorphism (tek nükleotid polimorfizmi)

lanması 2 gün sürebilen 7 basamaktan oluşur (Şekil 1) (1, 8). HIV-1, HBV, HCV ve CMV viral yüklerinin saptanması, mRNA kantitasyonu, HIV-1 ve HPV'nin *in-situ* saptanması için tasarlanmış bDNA testleri bulunmaktadır (1, 5, 13). Termal döngü cihazlarına gereksinim duyulmaması, düşük kontaminasyon olasılığı, herhangi bir enzime gerek duyulmaması ve kantitasyona uygun olması gibi avantajlara sahip olan bDNA testlerinin en önemli dezavantajları ise saptama duyarlılıklarının PCR temelli yöntemlere kıyasla daha düşük olması ve test süresinin uzunluğudur (1, 5, 14). Bununla beraber yeni nesil testlerin duyarlılıkları artırılmış, HIV-1 için plazmada 50-75 kopya/ml saptama duyarlılığı değerine ulaşılmıştır (1).

bDNA tekniği amplifikasyon basamakları

Birinci basamak: Nükleik asitlerin mikrokuyucuk yüzeyine sabitlendiği basamaktır. İlk olarak viral partiküllerden, hücrelerden veya fikse edilmiş dokulardan hedef nükleik asitler (DNA veya RNA) serbestleştirilir ve nükleik asit içeren numuneler bu biyolojik materyallerdeki RNaz ve DNaz'ların inaktive edilmesi için proteinaz K ve deterjanlarla muameleye tabi tutulur. Araştırılmak istenilen hedefe bakılmaksızın tüm bDNA testlerinde sabit prob olarak aynı oligonükleotitler kullanılır. Sabit problemlerin serbest uçları yakalayıcı (capture) problemlerin bağlanmasına uygun olarak dizayn edilmiştir. Yakalayıcı problemler ise bir uçları

sabit problemlere diğer uçları da hedef nükleik asitlerde yer alan spesifik sekanslara komplementer diziler içerecek şekilde tasarlanmıştır. Yakalayıcı problemler doğrudan sabit problemlere bağlı olarak bulunabileceği gibi solüsyon içerisinde serbest olarak da bulunabilirler. Nükleik asitlerin daha iyi sabitlenebilmesi için bu problemler bir hedef nükleik asidin birden çok bölgesine bağlanabilecek çeşitlilikte tasarlanırlar. İkinci basamak: Hedef (target) problemlerin mikrokuyucuk yüzeyine sabitlenen nükleik asitlerle hibridize olduğu basamaktır. Yakalayıcı problemlere benzer olarak hedef problemler de bir hedef nükleik asidin birden çok bölgesine hibridize olabilecek şekilde tasarlanırlar. Hedef nükleik asitlerdeki korunmuş bölgeler ne kadar fazla sayıda hedef prob tasarlamaya uygunsa test sonunda elde edilmesi beklenen teorik sinyal artışı o kadar yüksek olacaktır. Üçüncü basamak: Preampliciyer prob hibridizasyon basamağıdır. Bir gecelik inkübasyon sonrası hibridize olmamış target problemlerin, lizis reaktiflerinin ve hücresel debrisin ortamdan uzaklaştırılması için mikrokuyucuklar yıkanır ve kuyucuklara her biri 14 adet tekrarlayıcı sekans içeren preampliciyer prob karışımı eklenir. Her bir preampliciyer problemin nükleik asit-prob kompleksine bağlanabilmesi için iki adet hedef proba aynı anda bağlanması gerekmektedir. Bu tasarım spesifik olmayan hibridizasyonları minimize etmek için geliştirilmiştir. Dördüncü basamak: Amplifiyer prob hibridizasyon basamağıdır. Amplifiyer problemler



Şekil 1: Örnek bir bDNA testinde reaksiyon basamakları.

preamplifiyer problemlerle hibridize olarak nükleik asit-prob kompleksine bağlanırlar. Böylece sinyal amplifikasyon multimeri ya da bDNA kompleksleri olarak adlandırılan yapılar oluşur. Her amplifiyer üzerinde enzim işaretli problemlerin bağlanması için çok sayıda bağlantı bölgesi bulunur. Beşinci basamak: Hibridize olmamış amplifiyer problemler uzaklaştırıldıktan sonra numunelere enzim işaretli problemler olarak adlandırılan alkalin fosfat-modifiye oligomerler eklenir ve bu problemlerin amplifiyer problemler üzerindeki tekrarlayan sekanslar ile hibridize olması sağlanır. Altıncı basamak: Hibridize olmayan işaretli problemler uzaklaştırıldıktan sonra ortama eklenen dioksetan substrat, işaretli probdaki alkalin fosfat ile kimyasal reaksiyona girerek kemilüminesan sinyal üretimine neden olur. Test sonunda elde edilen sinyal miktarı hedef nükleik asit miktarı ile lineer olarak ilişkilidir. Yedinci basamak: Bu basamakta üretilen kemilüminesan sinyal bir fotomultiplier tüp aracılığıyla ölçülür ve elde edilen sinyal eğrisi miktarı bilinen bir örneğe ait sinyal eğrisi ile karşılaştırılır ve rölatif ışık üniteleri (RLU) belirlenerek numunedeki hedef nükleik asit miktarının kantitatif analizi yapılır (1, 5, 8).

Birinci nesil bDNA testleri 1990'ların başlarında Chiron (ABD) tarafından geliştirilmiştir. Günümüzde üçüncü nesil teknoloji kullanılarak üretilen testlerde prob dizaynı geliştirilmiş ve duyarlılık artışı sağlanmıştır (8). Preamplifiyer problemler iki hedef proba bağlanacak şekilde dizayn edilmiş ve böylece nonspesifik bağlanmalarla ilişkili arka plan sinyalleri azaltılmıştır. Ayrıca izositozin (Iso5MeC) ve izoguanozin (IsoG) gibi doğal olmayan izomerik bazlar içeren ve hedef nükleik asitlere ya da bDNA kompleksinin diğer ünitelerine (hedef problemler, preamplifiyerler, amplifiyerler ve işaretli problemler) bağlanmayan spesifik problemler dizayn edilmiştir (8). Ayrıca hedef dışı nükleik asitlerle nonspesifik bağlanma olasılığı azaldığı için testin sensitivite ve spesifitesi artarken sinyal/arka plan kirliliği oranı 30 kat kadar arttırılmıştır (15). Uzun problemlerin nükleik asitlere daha stabil olarak bağlanacağı düşünülerek her biri 30 nükleotit uzunluğunda çoklu yakalayıcı ve hedef problemler da dizayn edilmiş ve denenmiştir, ancak uzun problemlerin yanlış eşleşmelere neden olabildiği görülmüştür (1). Yanlış eşleşmelerin önüne geçilmesinde uygun prob tasarımı önemli olup, bDNA testlerinde prob dizaynı için geliştirilen bir yazılım programı da bulunmaktadır (16).

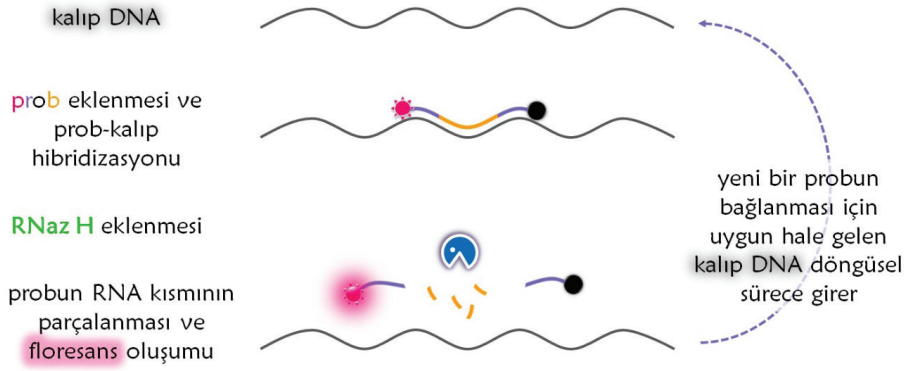
Üçüncü nesil bDNA testlerinden Versant HIV-1 RNA 3.0 (Siemens Healthcare, ABD) ve Versant HCV RNA 3.0 (Siemens Healthcare, ABD) FDA tarafından onay almıştır (2). Versant HIV-1 RNA 3.0 testinde teorik olarak 11.564 kat artmış sinyal (59 preamplifiyer molekül × her preamplifiyer molekülde amplifiyer problemler için 14 bölge × her amplifiyer molekülde işaretli problemler için 14 bölge) elde edilir ve testin saptama duyarlılığı 50-75 kopya/ml değerine ulaşır (1). Versant HCV RNA 3.0 ve Versant HBV 3.0 testlerinde ise teorik olarak sırasıyla 2352 ve 7448 kat sinyal artışı beklenir ve her iki testin saptama duyarlılıkları sırasıyla 615 IU/

ml ve 3300 kopya/ml'dir. Bu testler için beklenen teorik amplifikasyonun HIV-1 testine göre daha düşük olmasının nedeni hedef nükleik asitler içerisindeki iyi korunmuş sekanslardan üretilebilen hedef prob sayısının HIV-1 ile kıyaslandığında göreceli olarak daha az olmasıdır (1, 2). Bir çalışmada PCR ve Versant HCV RNA 3.0 yöntemlerinin HCV genotipleri (genotip 1-5) için kantitasyon kapasiteleri değerlendirilmiş ve bDNA yönteminin genotip 1, 2 ve 3 için daha düşük kantitasyon değeri verdiği tespit edilmiştir (17). Bir diğer ticari test olan Quantiplex CMV 2.0 kantitatif bDNA testinin saptama duyarlılığı 900 kopya/10⁶ lökosit iken, testin yürütülmesi için çok sayıda lökosit elde edilmesinin gerekmesi ve testin 24 saatte tamamlanabilmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (1, 14, 18). Bilinen ticari testler dışında bDNA testlerinin yeni tekniklerle kombine edildiği tanınal uygulamalar da denenmiştir. Bir araştırmada H5 ve H7 alt tipi avian influenza suşlarının saptanması ve eşzamanlı tanımlanması için bDNA sinyal amplifikasyon teknolojisinin süspansiyon platformdaki etkinliği incelenmiştir (19). bDNA ve luminex xMAP teknolojisinin kombine edildiği multipleks testler (Quantigene Plex assay; Affymetrix, Fremont, CA) ayrıca gen ekspresyonu çalışmalarında da kullanılmıştır (20, 21).

Döngüsel prob (Cycling Probe, CP) tekniği

CP tekniği bir izotermal lineer sinyal amplifikasyon reaksiyonudur (1). Bu testte tek zincirli hedef DNA molekülü sentetik olarak üretilen ve hedef DNA ile spesifik komplementer sekans içeren bir adet kimerik DNA-RNA-DNA probu ile hibridize edilir (1). Kimerik probdaki RNA kısmının ideal uzunluğunun hedef DNA molekülündeki 4 baz ile tam komplementer 4 pürin rezidüsü içerecek şekilde olduğu gösterilmiştir (22). Bu tekniğin bazı uygulamalarında DNA-RNA-DNA probundaki DNA parçalarından biri florofor ile işaretlenir ve diğer DNA parçası florofora yakınlığı nedeniyle florofordan yayılan ışığı (bütünlüğü bozulmamış bir probda) absorbe eden bir quencher içerir. Ortama RNaz H ilave edildiğinde hedef DNA ile hibridize durumdaki probun RNA kısmı bu enzim tarafından parçalanır ve probun diğer iki parçası (DNA kısımları) hedef DNA'dan ayrılır ve böylece hedef DNA bir sonraki kimerik prob ile hibridize olmaya hazır hale gelir (1). Bu arada her hedef DNA'dan sabit sıcaklıkta lineer olarak çoğalan DNA fragmanları oluşturulur (Şekil 2). Hedef nükleik asitlerin varlığı bu DNA parçalarının jel elektroforezinde yürütülmesi ile veya bir immünoassay (lateral-flow strip) testi ile saptanabilir (1).

Yöntem bakteriyel genomik sekansların saptanması, *Staphylococcus aureus* metisilin direncinin ve çoklu ilaç direncinin gösterilmesi, enterokoklarda vankomisin direncinin saptanması (vanA ve vanB genleri) ve *Mycobacterium tuberculosis* direkt tekrarların karakterizasyonu için kullanılmıştır (1). ID Biomedical (Canada) ve Excimus Biotech (ABD) firmaları tarafından ticari testler de üretilmiştir (1). Bu teknik ayrıca PCR gibi real-time hedef amplifikasyon sistemlerinde veya rolling circle yöntemi gibi



Şekil 2: Döngüsel prob testinin reaksiyon prensibi.

prob amplifikasyon sistemlerinde amplifikasyon ürünü birikimini saptamak üzere modifiye edilmiştir (1). Human herpesvirus 6A ve B saptanması için geliştirilen CP temelli real-time PCR testi bunun bir örneğidir (23). CP real-time PCR tekniği vahşi-tip varicella-zoster virus (VZV) ve Oka aşı kökenlerinin birbirinden ayırt edilmesi ve kantitasyonu için de kullanılmıştır (24). CP real-time PCR tekniği ile dizi analizi yönteminin kombine edildiği bir çalışmada ise NS5A inhibitörlerine dirençli HCV varyantlarının saptanması ve kantitasyonu başarılı bir şekilde test edilmiştir (25). Aynı yöntem amantadin ve oseltamivir dirençli influenza suşlarının saptanmasında ve tiplendirilmesinde de kullanılmıştır (26, 27). RCA (random-primed rolling circle amplification) tekniği ve elde edilen ürünlerin dizi analizi yaklaşımı ise yeni polyomavirus türlerinin keşfedilmesinde kullanılmıştır (28).

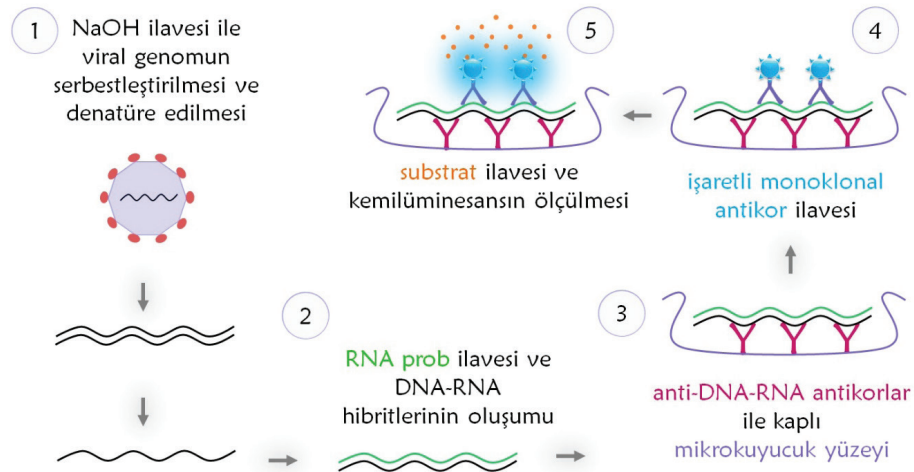
Hibrit yakalama (hybrid capture, HC) tekniği

HC sistemi RNA: DNA hibridlerinin poliklonal antikorlar ile yakalanması ve oluşan komplekse bağlanan işaretli monoklonal antikorlarla kemilüminesan sinyal üretilmesi prensibi ile çalışan bir yöntemdir (8). HC testinin numune hazırlama basamağının kolay olması sayesinde numunelerin işlenmesi ve test edilmesi hızlı ve verimli olarak yapılabilmektedir. Tüm süreç yaklaşık üç buçuk saat sürmekte ve aynı gün içerisinde sonuç alınabilmektedir (8). Testin metodolojisi DNA hedefleri tespit etmek için bir RNA probu kullanıldığı beş sıralı basamak içerir (Şekil 3). Bu yöntemle RNA hedefler tespit edilmek istendiğinde ise DNA proplar kullanılır (8). Teorik olarak 3000 kat amplifikasyon sağlayan HC sistemi (Digene Corporation, ABD), HBV ve CMV viral yüklerinin tespiti, HPV tanısı, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Chlamydia trachomatis* varlığının gösterilmesi için kullanılmıştır (1, 11, 14).

HC tekniği amplifikasyon basamakları

Birinci basamak: Hedef DNA'nın hücrelerden serbestleştirilmesi ve nükleik asitlerin denatüre edilmesi işlemlerinin yapıldığı basamaktır. Bu basamakta viral veya bakteriyel hedef DNA'ları hücrelerden serbestleştirmek ve hibridi-

zasyona uygun olan tek zincirli hale getirmek için numuneler bir denatüran ile muamele edilir. Bu amaçla kullanılan alkali bir madde olan sodyum hidroksit çözümü ile hem hücreler parçalanır hem de DNA kimyasal olarak denatüre edilir (1, 8). İkinci basamak: Tek zincirli hedef DNA'ların tek zincirli RNA proplar ile hibridize olduğu basamaktır. Numune bir kaba transfer edilir ve çözeltiye hedef DNA sekansı ile komplementer RNA proplar ilave edilerek inkübe edilir ve çift-zincirli RNA:DNA hibridleri oluşur. RNA proplar tam genom (HPV için 8 kb ve HBV için 3,2 kb) veya kısmi genom uzunluğunda (CMV genomunun %17'sini içeren 4 prob) tasarlanabilmektedir (1). Üçüncü basamak: RNA:DNA hibridlerinin yakalanarak katı faz üzerine bağlanması basamağıdır. Bu adımda numuneler RNA:DNA hibridlerine spesifik olarak bağlanan yakalayıcı (capture) poliklonal anti-RNA-DNA hibrid antikorları ile kaplanmış olan ikinci bir kaba (mikrotitre kuyucuklara) transfer edilir. Böylece çoklu RNA:DNA hibridleri mikroplak yüzeyini kaplayan spesifik antikorlar tarafından yakalanır ve katı yüzeye bağlanır (1, 8, 29). Dördüncü basamak: Yakalama işleminden sonra mikrokuyucuklar yıkanır ve ortama yakalanmış DNA-RNA hibridlerine bağlanma özelliğine sahip konjuge enzim (alkalen fosfataz) işaretli monoklonal antikorlar ilave edilir ve karışım inkübe edilir. Alkalin fosfataz enzimi kemilüminesan substrat (Emerald II ve LumiPhos 530 gibi) varlığında sinyal amplifikasyonuna neden olan bir ışık üretir (1, 8). Her işaretli antikora birkaç alkalin fosfataz molekülü konjuge edilmiştir ve her yakalanan hibride birden fazla konjuge antikor bağlanır. Teorik olarak hedef genom başına en az 1000 antikor bağlanır ve her antikora 3 alkalin fosfataz bağlandığında 3000 kat görece sinyal amplifikasyonu üretilir. Beşinci basamak: Amplifiye kemilüminesan sinyalin bir luminometre ile ölçüldüğü son basamaktır (1, 8). Tüm bağlanmamış veya serbest bileşenleri uzaklaştırmak için mikroplak yıkanır. RNA:DNA hibridleri ile işaretli antikorlar kabin yüzeyine bağlı kalırlar. Kuyucuklara alkalin fosfataz ile parçalanabilen kemilüminesan dioksetan substrat ilave edilir. Bu substratın parçalanmasıyla ışık emisyonu oluşur ve bu emisyon bir luminometre ile saptanarak ölçülür.



Şekil 3: HC testinde temel reaksiyon basamakları.

HC tekniği HBV, HPV ve CMV tanıları için ayrıntılarıyla tanımlanmıştır (1, 11, 14). HPV tanısı için geliştirilen ilk ticari test 1995'de Digene tarafından kullanıma sunulan HC1 testidir (11). Sonraki yıllarda, mikrotitre plakları yerine tüplerde çalışılan ve sıvı bazlı servikal numunelerde yüksek riskli (HR) HPV tiplerinin saptanmasına olanak veren FDA onaylı yeni nesil testler (HC2) geliştirilmiştir (8, 11). HPV için tasarlanan HC2 yöntemi HPV L1 gen bölgesini hedefleyen nonradyoaktif bir sinyal amplifikasyon testidir (30). Düşük riskli (LR) beş HPV tipi [6, 11, 42, 43 ve 44] ve 13 adet HR-HPV tipine [16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68] ait iki prob kokteyli içerir. Bu test FDA tarafından onaylanan (1999 yılında) ilk HPV yardımcı tanı-tarama testidir (11).

HC2 sinyali bir luminometrede göreceli ışık birimlerinde (RLU) okunur. Pozitif kontrol numunesi olarak 1 pg/ml HPV tip 16 içeren bir tüp kullanılırken, test edilecek örnekler bu tüp ile karşılaştırılır. Test örneği RLU/kontrol (RLU / CO) oranları 1'den büyük olan test numuneleri pozitif olarak değerlendirilir (31). Bu kesim noktası 5000 genoma eşdeğerdir ve yaygın HSIL prevalansının tespiti için optimum düzeyde duyarlılık ve özgüllük sağlaması nedeniyle tercih edilmiştir (30,31). HC2 saptama tarafından kaçırılması sadece HPV viral yükü çok düşük olduğunda muhtemeldir (31). HC2 klinik çalışmalarda dünya çapında yaygın olarak kullanılan ve sağlam ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiş olan bir tarama testidir (30). Diğer taraftan, HPV tanısında kullanılan HC2'nin bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Bu yöntem HR ve LR grupları ayırt edebilirken spesifik HPV genotip identifikasyonuna izin vermez. Tespit sınırı yaklaşık 5000 genoma eşit olduğundan PCR'a göre daha az duyarlıdır ve prob kokteylleri arasında çapraz reaktivite görülebilmektedir (30). NextGen (Qiagen) yönteminin çalışma prensibi HC2 testine benzerdir ve test profiline eklenen tip 66 ve 82 ile saptanabilen HR tip sayısı artırılmıştır (11, 32).

Tam kan örneklerinde çalışılan ve kantitatif veriler sunabilen HC CMV DNA (Digene) testinin ilk versiyonunda saptama duyarlılığı 5000 kopya/ml iken, ikinci versiyonunda bu değer 700 kopya/ml olacak şekilde geliştirilmiştir (14). Bu yöntemde hedef DNA'yı içeren örnekler, CMV genomunun yaklaşık olarak %17'sine denk gelen 40.000 bp uzunluğunda spesifik bir CMV RNA probu ile hibridize edilir (1,14). İşlemin hızı (6 saat) ve basit örnek işleme gibi avantajları yanında, kantitatif test için birçok kontrolün gerekli olması gibi dezavantajları da vardır (14). Günümüzde HBV, HCV ve HPV enfeksiyonlarının tanı ve takibinde saptama duyarlılıkları çok daha üstün olan (1-10 kopya/ml) ve aynı zamanda kantitatif sonuç verebilen tip-genotip spesifik moleküler tanı testleri tercih edilmektedir (6, 33, 34).

Invader tekniği

Invader yöntemi çalışma prensibi HC2 sisteminden tamamen farklı olan ve HC2'den daha güçlü amplifikasyon sağlayan (10^6 - 10^7 kat) bir sinyal amplifikasyon tekniğidir (11). Nükleik asitlerin hem saptanmasında hem de kantitasyonunda kullanılan bu yöntem tip spesifik hibridizasyon, hibridize problemlerin cleavase enzimi ile parçalanması ve oluşan floresansın ölçülmesi esasına göre çalışır (1). Third Wave Technologies (ABD) tarafından geliştirilen bu yöntem klinik pratikte faktör V Leiden, faktör II, ApoE saptanması, kistik fibrozis ve Tay-Sachs hastalıklarının tanısı, tek nükleotit değişikliklerinin (*single nucleotide polymorphism*, SNP) analizleri ve HPV, HCV, HBV ve HIV gibi viral etkenler de dahil olmak üzere spesifik nükleik asit kantitasyonu veya genotip tayini için de kullanılmıştır (1, 35-38).

Invader tekniği amplifikasyon basamakları

Invader yöntemi tek zincirli hedef DNA'nın iki farklı oligonükleotit ile hibridize edilmesine dayalıdır. Nükleik asitlerden elde edilen sinyal iki ayrı basamakta gerçek-

üçlü yapılarını tanıyamadığı için RNA hedefleri araştıran uygulamalarda öbakteriyumlardan elde edilen farklı bir cleavase enzimi kullanılır. RNA hedefler için primer ve invader proplar dizayn edilirken mRNA'daki splice bağlantı bölgeleri göz önüne alınmalıdır, çünkü intron sekanslar içeren DNA'lara göre dizayn edilen oligolar cleavase enzimi tarafından tanınmayacaktır (1).

Tiramid sinyal amplifikasyon teknolojisi

TSA tekniği spesifik nükleik asitlerin veya proteinlerin saptanması ve lokalizasyonlarının belirlenmesine yönelik uygulamaları içerir. CARD (*catalyzed reporter deposition*) olarak da adlandırılır. Tiramid ile işaretli veya işaretli tiramidin bağlanabileceği özel bir parçası olan modifiye nükleik asit problemlerinden biri kullanılabilir. Bu problemler DNA veya RNA hedeflerle hibridize olmaya uygundur (genellikle *in situ* hibridizasyon gerçekleşir). Bu yöntem ortama *horseradish* peroksidaz ve hidrojen peroksit eklince aktive olan tiramid (quinone benzeri yapı) formlarının komşu fenol grupları ile (esasen komşu proteinlerin tirozin rezidüleri ile) kovalen bağlar oluşturması esası üzerine çalışır. Sinyal oluşumu direkt veya tiramid ile konjuge edilmiş moleküller (biotin, trinitrofenol gibi haptenler veya florokromlar) aracılığı ile indirekt olarak elde edilebilir. Sinyal dar bir alanda sınırlandırıldığı için yoğunlaşır ve sensitivitesi *in situ* hibridizasyon tekniklerindeki geleneksel biyotin-avidin komplekslerine göre 500-1000 kat daha artırılmış olur (1). Yöntem HPV, HIV, 16S ribozomal RNA ve antimikrobiyal direnç genlerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır (1).

TSA tekniği amplifikasyon basamakları

Horseradish peroksidaz modifiye streptavidin (HPMS) ile bağlı biyotin işaretli problemler kullanılarak lokalize sinyal üreten kompleksin büyüklüğü artırılabilir. Biotin modifiye tiramid moleküllerinin hedef üstünde birikimi ile oluşan ilk kompleks HPMS tarafından tanınan lokalize bir depozit vazifesini görür ve ilk kompleks üzerinde biriken HPMS'ler ayrı bir katman oluşturur. Son olarak ortama 3,3'

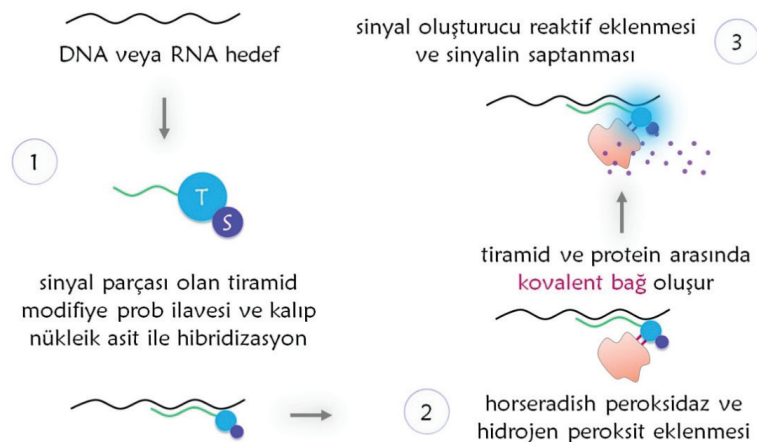
diaminobenzidin gibi bir substrat ilave edilince çözünmeyen kahverengi bir çökelti oluşur (Şekil 5). TSA yöntemi ile virüs veya diğer mikroorganizmaların hücre ve doku preparatlarındaki tek kopyalarının bile tespiti mümkün olabilir (1).

HPV DNA varlığını saptamak için tiramid temelli *in-situ* hibridizasyonun sinyal amplifikasyonuna dayalı bir yöntem geliştirilmiştir. Ancak saptama eşiği düşük olduğundan bu yöntem tutarlı sonuçlar elde etmede yetersiz kalmıştır. Sonuç olarak, sitolojistlerin ilgi duymasına rağmen, bu yöntem büyük ölçekli HPV tarama testleri için kabul görmemiştir (30). Literatürde HSV (*herpes simplex virus*), HHV-8 (human herpes virus-8; Kaposi sarkomu ilişkili herpesvirus) ve HIV enfeksiyonlarının tanısı için TSA yönteminin kullanıldığına dair veriler bulunmakla beraber, standardize edilmiş ticari formatta testleri bulunmamaktadır (41-43). RSV (*respiratory syncytial virus*) saptanması için tanımlanan bir immünojenik sinyal amplifikasyonu testinde altın nanopartiküllerinin ve tiramid moleküllerinin kullanıldığı immüno-biyosensörler ile klasik ELISA testlerine göre önemli ölçüde duyarlılık artışı elde edildiği bildirilmiştir (44).

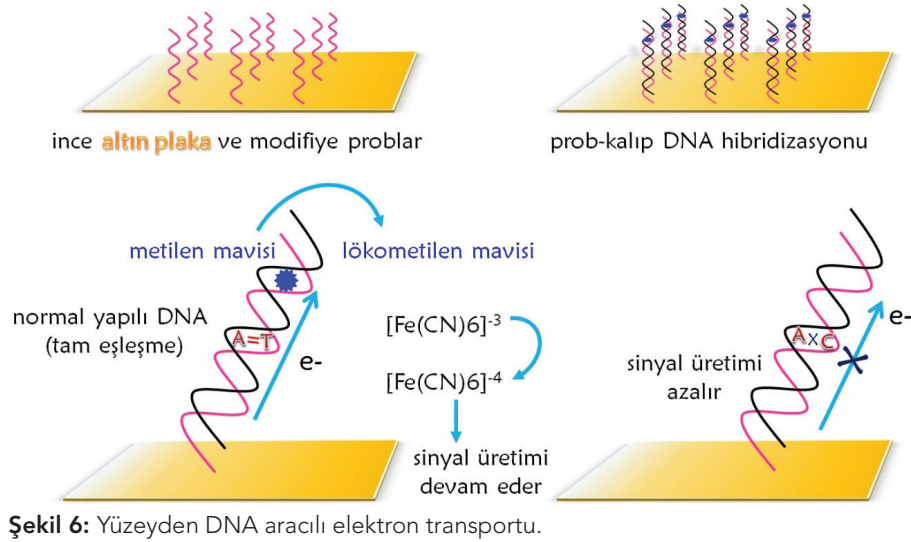
Diğer sinyal amplifikasyon teknikleri

Yukarıda açıklanan sinyal amplifikasyon tekniklerinin yanı sıra, bazen "doğrudan saptama teknikleri" olarak da adlandırılan ve nükleik asitleri saptamak için sinyal amplifikasyon tekniklerinde olduğu gibi sinyal birikimine dayalı olarak çalışan başka teknikler de vardır. Sinyal amplifikasyon tekniklerinin aksine, doğrudan saptama teknolojileri problemlerin hibridizasyonundan direkt sinyal üretir. Bu tekniklerde alkalen fosfat gibi enzimler kullanılarak sinyal birikiminin geliştirilmesi veya diğer sinyal artırıcı mekanizmalar kullanılmaz (1).

Doğrudan saptama tekniklerden biri ince bir altın plaka üzerine sabitlenen DNA dubleksleri arasından elektron transportu ve transportun elektrokimyasal olarak görünlümesi prensibine dayanmaktadır (1, 45, 46). Bu



Şekil 5: Tiramid sinyal amplifikasyonu.



Şekil 6: Yüzeysel DNA aracılı elektron transportu.

teknik yanlış eşleşmiş hibridleri Watson-Crick eşleşmeli hibridlerden mükemmel bir şekilde ayırmaktadır. 5' uçlarında tiyol ile sonlandırılmış alkil zincirleri türetilen modifiye DNA problemlerinin hedef DNA ile çözelti içerisinde hibridize olmasına izin verilir (1). İlk olarak hedef DNA ile komplementer sekanslara sahip tek zincirli modifiye DNA problemler sentezlenir ve altın plaka üzerine sabitlenir. Bu problemlerin uç kısımlarına oksido-redüksiyona ve ölçülebilir elektron akımına neden olan redox parçalar (metilen mavisi veya daunomisin) eklenir. Modifiye problemlerin solüsyonda bulunan hedef DNA molekülleri ile hibridizasyonu sonucunda çift-zincirli DNA formları oluşur (1, 45-47). Bu hibridler altın yüzey üzerinde tek tabakalı bir yapı halinde birikirler. Düzenli bir yapı oluşturan tek tabakalarda dubleksler yüzeye yaklaşık olarak 70° yönelmiştir (1). Metilen mavisi veya daunomisin DNA'ya çok güçlü olarak bağlanırlar ve normal yapılı DNA'dan geçen elektron akımına bağlı olarak indirgenirler (45). Örneğin, DNA dubleksleri arasından akan elektronlar interkale durumdaki metilen mavisini lökometilen mavisine indirger, bu durum solüsyondaki [Fe(CN)6]3-ü (ferri-siyanür) [Fe(CN)6]4-e indirger (1, 46). Ortamda ferri-siyanür var olduğu sürece bu elektrokatalitik döngü içinde elektron akışı devam eder. Prob ve hedef nükleik asit arasında bir baz uyumsuzluğu varsa ya da DNA hasarlı ise elektron akışı azalır. Otokatalitik döngünün uzun süre devam ettirilmesi sinyal artışı ile sonuçlanır (Şekil 6). Böylece tam eşleşen ve yanlış eşleşen DNA problemleri arasında daha fazla farklılaşma oluşur (1).

Bir başka umut verici teknoloji hedef nükleik asitlerin altın nanopartiküller ile modifiye edilmiş hedef spesifik oligonükleotitler ile hibridizasyonu ve sonrasında oluşan ışık saçılma rezonansının saptanması prensibine dayanır (1). Birkaç farklı prob-modifiye nanopartikülün hedef DNA'nın birbirine yakın bölgelerine bağlanması veya

çoklu hedeflere bağlanan nanopartiküllerin kompleks formlar oluşturması sayesinde nanopartiküller birbirlerine yakınlaşırlar ve saçılan ışığın renginde bir kayma ortaya çıkar (1). Altın nanopartiküllerinin kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemlerin örnekleri HBV ve influenza gibi viral enfeksiyonlar için tanımlanmıştır (9, 48). Ayrıca, hairpin DNA biyosensörleri ve sinyal amplifikasyon tekniklerinin kombinasyonunun içeren yaklaşımların HCV, HIV ve HTLV-1 (*human T-lymphotropic virus-1*) gibi viral enfeksiyonların tanısında kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır (49, 50).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- F.Ş., R.G.; Yazı Taslağı- F.Ş., R.G.; Son Onay ve Sorumluluk- F.Ş., R.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- F.Ş., R.G.; Drafting Manuscript- F.Ş., R.G.; Final Approval and Accountability- F.Ş., R.G.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

KAYNAKLAR

1. Handricks DA, Comanor L. Signal Amplification-Based Techniques. In: Lorincz A, editor. Nucleic Acid Testing for Human Disease. New York: CRC/Taylor & Francis; 2006:19-64. [CrossRef]
2. Gullett JC, Nolte FS. Quantitative Nucleic Acid Amplification Methods for Viral Infections. Clin Chem 2015;61(1):72-8. [CrossRef]

3. Şahiner F, Gümrall R, Yıldızoğlu Ü, Babayiđit MA, Durmaz A, Yiđit N, et al. Coexistence of Epstein-Barr virus and Parvovirus B19 in tonsillar tissue samples: Quantitative measurement by real-time PCR. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2014;78(8):1288-93. [CrossRef]
4. Nolte F, Wittwer C. Nucleic Acid Amplification Methods Overview. In: Persing D, Tenover F, Hayden R, Ieven M, Miller M, Nolte F, et al, editors. *Molecular Microbiology*. Washington, USA: ASM Press; 2016:3-18.
5. Niesters HGM, van Leeuwen WB. Quantitative Isothermal Molecular Amplification Techniques (Chapter 7). In: van Pelt-Verkuil E, van Leeuwen WB, Witt R, editors. *Molecular Diagnostics*. Singapore: Springer; 2019:321-37. [CrossRef]
6. Şahiner F, Şener K, Gümrall R, Yapar M, Dede M, Yiđit N, et al. Üç farklı real-time PCR testinin karşılaştırmalı sonuçları: MY09/11 primerleri çoklu enfeksiyonları kaçırıyor. *Gulhane Med J* 2014;56(2):65-70. [CrossRef]
7. Yan L, Zhou J, Zheng Y, Gamson AS, Roembke BT, Nakayama S, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Mol Biosyst* 2014;10(5):970-1003. [CrossRef]
8. Wang YF. Signal Amplification Techniques: bDNA, Hybrid Capture. In: Tang YW, Stratton CW, editors. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. USA: Springer; 2006:228-42. [CrossRef]
9. Jin F, Li H, Xu D. Enzyme-free fluorescence microarray for determination of hepatitis B virus DNA based on silver nanoparticle aggregates-assisted signal amplification. *Anal Chim Acta* 2019;1077:297-304. [CrossRef]
10. Emmadi R, Boonyaratanakornkit JB, Selvarangan R, Shyamala V, Zimmer BL, Williams L, et al. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing a review of FDA-approved and cleared assays. *J Mol Diagn* 2011;13(6):583-604. [CrossRef]
11. Şahiner F. Genital İnsan Papillomavirus Enfeksiyonlarının Moleküler Tanısında Karşılaşılan Sorunlar ve Yeni Gelişmeler. *Mikrobiyol Bul* 2014;48(4):689-706. [CrossRef]
12. van der Sluis RM, van Montfort T, Centlivre M, Schopman NC, Cornelissen M, Sanders RW, et al. Quantitation of HIV-1 DNA with a sensitive TaqMan assay that has broad subtype specificity. *J Virol Methods* 2013;187(1):94-102. [CrossRef]
13. Gokahmetoglu S, Deniz E, Ozbay I, Atalay AM. Comparison of branched DNA and real-time polymerase chain reaction methods in quantitation of hepatitis B virus DNA. *Saudi Med J* 2007;28(11):1750-1.
14. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):533-54. [CrossRef]
15. Collins ML, Irvine B, Tyner D, et al. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Res* 1997;25(15):2979-84. [CrossRef]
16. Bushnell S, Budde J, Catino T, et al. ProbeDesigner: for the design of probesets for branched DNA (bDNA) signal amplification assays. *Bioinformatics* 1999;15(5):348-55. [CrossRef]
17. Sarrazin C, Gärtner BC, Sizmann D, Babiell R, Mihm U, Hofmann WP, et al. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol* 2006;44(3):729-37. [CrossRef]
18. Pellegrin I, Garrigue I, Binquet C, Chene G, Neau D, Bonot P, et al. Evaluation of new quantitative assays for diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3124-32.
19. Cha W, Ma Y, Saif YM, Lee CW. Development of microsphere-based multiplex branched DNA assay for detection and differentiation of avian influenza virus strains. *J Clin Microbiol* 2010;48(7):2575-7. [CrossRef]
20. Davies J, Maqsoodi B, Yang W, Ma Y, Luo Y, McMaster G. P25-S Gene Expression Profiling from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues Using the QuantiGene Branched DNA Assay. *J Biomol Tech* 2007;18(1):9.
21. Zhang A, Pastor L, Nguyen Q, Luo Y, Yang W, Flagella M, et al. Small interfering RNA and gene expression analysis using a multiplex branched DNA assay without RNA purification. *J Biomol Screen*; 2005;10:549-56. [CrossRef]
22. Harvey JJ, Lee SP, Chan EK, et al. Characterization and applications of CataCleave probe in real-time detection assays. *Anal Biochem* 2004;333(2):246-55. [CrossRef]
23. Ihira M, Yamaki A, Kato Y, Higashimoto Y, Kawamura Y, Yoshikawa T. Cycling probe-based real-time PCR for the detection of Human herpesvirus 6A and B. *J Med Virol* 2016;88(9):1628-35. [CrossRef]
24. Ihira M, Higashimoto Y, Kawamura Y, Sugata K, Ohashi M, Asano Y, et al. Cycling probe technology to quantify and discriminate between wild-type varicella-zoster virus and Oka vaccine strains. *J Virol Methods* 2013;193(2):308-13. [CrossRef]
25. Uchida Y, Kouyama J, Naiki K, Sugawara K, Ando S, Nakao M, et al. Significance of variants associated with resistance to NS5A inhibitors in Japanese patients with genotype 1b hepatitis C virus infection as evaluated using cycling-probe real-time PCR combined with direct sequencing. *J Gastroenterol* 2016;51(3):260-70. [CrossRef]
26. Suzuki Y, Saito R, Zaraket H, Dapat C, Caperig-Dapat I, Suzuki H. Rapid and specific detection of amantadine-resistant influenza A viruses with a Ser31Asn mutation by the cycling probe method. *J Clin Microbiol* 2010;48(1):57-63. [CrossRef]
27. Suzuki Y, Saito R, Sato I, Zaraket H, Nishikawa M, Tamura T, et al. Identification of oseltamivir resistance among pandemic and seasonal influenza A (H1N1) viruses by an His275Tyr genotyping assay using the cycling probe method. *J Clin Microbiol* 2011;49(1):125-30. [CrossRef]
28. Us, D. New, newer, newest human polyomaviruses: how far?. *Mikrobiol Bul* 2013;47(2):362-81. [CrossRef]
29. HC2 High-Risk HPV DNA Test. Digene Catalog Number 5101-1296. Digene Corporation Gaithersburg, MD USA, 2002.
30. 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. [CrossRef]
31. Gravitt PE, Viscidi RP. Measurement of Exposure to Human Papillomaviruses (Chapter 5). In: Rohan TE, Shah KV, editors. *Cervical Cancer: From Etiology to Prevention (Cancer Prevention-Cancer Causes)*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004:119-41. [CrossRef]
32. 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. [CrossRef]

33. Maasoumy B, Vermehren J. Diagnostics in hepatitis C: The end of response-guided therapy? *J Hepatol* 2016;65(1 Suppl):S67-S81. [\[CrossRef\]](#)
34. Allice T, Cerutti F, Pittaluga F, Varetto S, Gabella S, Marzano A, et al. Comparison of the Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV Test versus the Cobas AmpliCor HBV monitor for HBV-DNA detection and quantification during antiviral therapy. *New Microbiol* 2008;31(1):27-35.
35. Tadokoro K, Yamaguchi T, Egashira T, Hara T. Quantitation of viral load by real-time PCR-monitoring Invader reaction. *J Virol Methods* 2009;155(2):182-6. [\[CrossRef\]](#)
36. Germer JJ, Majewski DW, Yung B, Mitchell PS, Yao JD. Evaluation of the invader assay for genotyping hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 2006;44(2):318-23. [\[CrossRef\]](#)
37. Wong DK, Yuen MF, Yuan H, Sum SS, Hui CK, Hall J, et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2004;40(3):727-37. [\[CrossRef\]](#)
38. Constantine NT, Kabat W, Zhao RY. Update on the laboratory diagnosis and monitoring of HIV infection. *Cell Res* 2005;15(11-12):870-6. [\[CrossRef\]](#)
39. 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. [\[CrossRef\]](#)
40. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8(10):1139-62. [\[CrossRef\]](#)
41. Garrigues HJ, Rubinchikova YE, Rose TM. KSHV cell attachment sites revealed by ultra sensitive tyramide signal amplification (TSA) localize to membrane microdomains that are up-regulated on mitotic cells. *Virology* 2014;452-453:75-85. [\[CrossRef\]](#)
42. Kotronias D, Kapranos N. Herpes simplex virus as a determinant risk factor for coronary artery atherosclerosis and myocardial infarction. *In Vivo* 2005;19(2):351-7.
43. Strappe PM, Wang TH, McKenzie CA, Lowrie S, Simmonds P, Bell JE. Enhancement of immunohistochemical detection of HIV-1 p24 antigen in brain by tyramide signal amplification. *J Virol Methods* 1997;67(1):103-12. [\[CrossRef\]](#)
44. Zhan L, Yang T, Li CM, Wu WB, Huang CZ. Sensitive immunosensor for respiratory syncytial virus based on dual signal amplification of gold nanoparticle layer-modified plates and catalyzed reporter deposition. *Sens Actuators B Chem* 2018;255(2):1291-7. [\[CrossRef\]](#)
45. Treadway CR, Michael GH, Jacqueline KB. Charge transport through a molecular π -stack: double helical DNA. *Chemical Physics* 2002;281(2-3):409-28. [\[CrossRef\]](#)
46. Gorodetsky AA, Buzzeo MC, Barton JK. DNA-mediated electrochemistry. *Bioconjug Chem* 2008;19(12):2285-96. [\[CrossRef\]](#)
47. Genereux JC, Barton JK. Mechanisms for DNA charge transport. *Chem Rev* 2010;110(3):1642-62. [\[CrossRef\]](#)
48. Karash S, Wang R, Kelso L, Lu H, Huang TJ, Li Y. Rapid detection of avian influenza virus H5N1 in chicken tracheal samples using an impedance aptasensor with gold nanoparticles for signal amplification. *J Virol Methods* 2016;236:147-56. [\[CrossRef\]](#)
49. Abolhasan R, Mehdizadeh A, Rashidi MR, Aghebati-Maleki L, Yousefi M. Application of hairpin DNA-based biosensors with various signal amplification strategies in clinical diagnosis. *Biosens Bioelectron* 2019;129:164-74. [\[CrossRef\]](#)
50. Lu M, Xu L, Zhang X, Xiao R, Wang Y. Ag(I)-coordinated hairpin DNA for homogenous electronic monitoring of hepatitis C virus accompanying isothermal cycling signal amplification strategy. *Biosens Bioelectron* 2015;73:195-201. [\[CrossRef\]](#)