

*COLLÈGE NATIONAL
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS
Président : Professeur J. Lansac*

Extrait des Mises à jour en Gynécologie Médicale

—

**Volume 2009
publié le 9.12.2009**



*TRENTE-TROISIÈMES JOURNÉES NATIONALES
Paris, 2009*

HPV : actualités.

Place du génotypage et des ARN messagers

D. RIETHMULLER ¹, R. RAMANAH ¹, J.L. PRÉTET ²,
C. CLAVEL ³, C. MOUGIN ²
(Besançon, Reims)

Résumé

La prévention secondaire du cancer du col de l'utérus a pour but d'éviter l'invasion, ce qui nécessite des méthodes de dépistage sensibles pour éviter le douloureux problème des faux négatifs, mais également spécifiques afin de ne pas référer trop de faux positifs. Les faux positifs peuvent être « triés » par des tests de seconde ligne pour en diminuer le nombre.

Si l'introduction de la recherche de l'HPV par des tests « génériques » dans le dépistage primaire du cancer du col de l'utérus est soutenue par une littérature à haut niveau de preuve, il n'en est pas de même pour les autres tests, en particulier le génotypage et les ARNm.

Si le génotypage apparaît actuellement comme le probable futur outil de triage réflexe des tests HPV « génériques » positifs à cytologie normale, il reste à trouver à la recherche des transcrits sa place dans l'algorithme du dépistage. Si la présence d'ARNm

- 1 - CHU de Besançon - Service de gynécologie-obstétrique - 25030 Besançon cedex
- 2 - CHU de Besançon - Laboratoire de biologie moléculaire - 25030 Besançon cedex
- 3 - CHU de Reims - Unité de biologie cellulaire et moléculaire du laboratoire Pol Bouin - 45 rue Cognacq Jay - 51092 Reims cedex

pourrait sélectionner les patientes à risques de progression, leur révélation nécessite une excellente qualité du prélèvement, ce qui rend complexe leur utilisation en première ligne d'un dépistage, en particulier en auto-prélèvement. La charge virale, les recherches d'expression virale, et d'autres marqueurs cellulaires représentent des pistes sérieuses de recherche, mais ne peuvent pour l'instant être extrapolés à une utilisation pratique. Il est indéniable que le plus important est d'avoir une large validation clinique avec un seuil clinique pertinent, et à ce jour seuls 2 tests (HC2® et la PCR GP5 GP6) remplissent ce cahier des charges. La complexité de certains nouveaux tests avec des techniques à standardiser, des exigences qualitatives pour le prélèvement et sa conservation, des coûts non négligeables, une absence de validation à large échelle, rendent pour l'instant leur diffusion peu aisée.

Pour conclure, à ce jour seul le triage génotypique réflexe HPV 16-18 des tests « génériques » positifs pourrait, parmi les nouveaux tests, rapidement se positionner dans l'algorithme du dépistage.

Mots clés : cancer du col de l'utérus, dépistage, HPV, ADN, génotypage, ARNm

INTRODUCTION

Le but du dépistage dans la prévention du cancer du col de l'utérus est bien d'éviter l'invasion avec son pronostic réservé et ses séquelles importantes, et non pas de mettre en évidence des anomalies cytologiques mineures ou une infection passagère dont l'histoire naturelle est très majoritairement la guérison spontanée. C'est tout le problème de la sensibilité (capacité d'un test à donner un résultat positif lorsque la maladie est présente) et de la spécificité (capacité d'un test à donner un résultat négatif lorsque la maladie n'est pas présente) d'un test de dépistage [1].

Si la littérature est à ce jour claire et à haut niveau de preuve scientifique concernant l'intérêt de l'introduction de la recherche de l'HPV dans le dépistage primaire du cancer du col de l'utérus, prototype du cancer viro-induit [2, 3], cette démonstration n'est attribuable qu'à 2 seuls tests qui sont l'Hybrid Capture 2® et la PCR GP5 GP6. En effet, la multiplication récente des techniques de révélation quantitative et qualitative du génome viral HPV ou de son expression doit nous interroger sur leur efficacité réelle en pratique clinique et leur positionnement éventuel dans l'algorithme d'un

dépistage. Il ne faudrait pas qu'une utilisation mal à propos ou inappropriée et avant toute démonstration sur de larges cohortes de ces différentes méthodes de biologie moléculaire soit un frein à l'indispensable intégration des tests HPV dans le dépistage primaire du cancer du col.

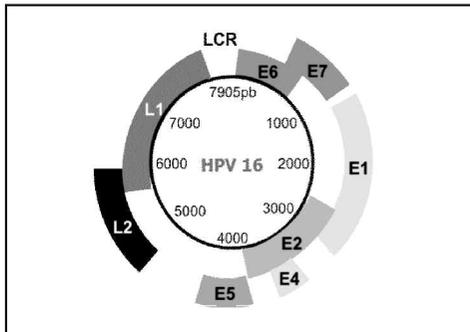
Nous tenterons dans ce travail de faire le point sur ces différentes techniques et leurs résultats actuels, et nous discuterons de la place potentielle qu'elles pourraient avoir dans la prévention secondaire du cancer du col de l'utérus.

LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIES MOLÉCULAIRES UTILISÉES POUR LA RÉVÉLATION DE HPV

Il est théoriquement possible de mettre en évidence le seul facteur de risque indépendant de la carcinogenèse cervicale qu'est le portage persistant en HPV à haut risque (HPV-HR) par différents biais directs ou indirects.

Le premier est de révéler la présence d'un ou plusieurs HPV-HR sans connaître le nombre de génotypes (infection multiple ou non) ni le ou les génotypes exacts, ni l'importance quantitative du portage viral (charge virale). On peut à ce jour déterminer le ou les génotypes présents, mais également déterminer quantitativement la charge virale globale ou spécifique. Enfin, on peut démontrer le risque de façon indirecte en se basant sur l'expression du génome viral HPV-HR en révélant les transcrits (ARN messagers).

Figure 1 - Virus HPV sont des petits virus nus à ADN double brin dont un seul est codant et d'environ 8 kilobases



Si aujourd'hui il est admis avec des niveaux de preuve de grade A que la capture d'hybrides (HC2®) et la PCR GP5 GP6 sont significativement plus sensibles pour le dépistage des CIN2+ que la cytologie cervico-utérine, il n'est pas encore démontré que les autres techniques de révélation d'une infection persistante à HPV HR aient la même utilisation possible en première ligne d'un dépistage primaire.

Par contre, un des problèmes majeurs du dépistage viral est sa spécificité inférieure au frottis cervico-utérin et sa difficulté à caractériser parmi les patientes positives celles qui sont réellement à risque d'invasion. Les techniques de génotypage ou celles basées sur les ARNm pourraient avoir un intérêt pour gérer les faux positifs du dépistage viral primaire, c'est-à-dire dans le triage des tests HPV « génériques ». Ce triage réalisé sur le même prélèvement (en phase liquide) et sans reconvoquer les patientes devrait permettre de pallier le problème de la spécificité et de diminuer largement les faux positifs afin de ne référer que les patientes à risque réel de progression et donc d'invasion.

Techniques basées sur la révélation de l'ADN viral

Anciennes technologies moins sensibles (pour mémoire) :

- hybridation *in situ* (HIS),
- Dot Blot,
- Southern Blot.

Nouvelles technologies très sensibles :

- hybridation en phase liquide,
- PCRs multiplex ou non (détection colorée ou fluorescente... à DNA chips),
- oligonucléotides pour PCR :
 - MY09/11, GP5+/6+, SPF 10,
 - PCR de type d'HPV,
 - Real Time-PCR (RT-PCR...) : il s'agit d'une PCR quantitative qui permet l'évaluation du type et de la charge virale,
 - ARNm E6/E7 HPV-HR (NASBA, RT-RT-PCR...).

Hybridation en phase liquide :

- Détection d'un cocktail d'HPV-HR (13 génotypes d'HPV-HR) :
 - Hybrid Capture 2® (Qiagen) (pas d'extraction de l'ADN nécessaire),
 - Amplicor® (Roche) (nécessite une extraction d'ADN).

Génotypage (avec extraction d'ADN) :

- Linear Array® (Roche) : détecte 37 génotypes d'HPV (13 HR + 9 risque intermédiaire (IR) + 15 bas risque (BR)),
- INNO-Lipa HPV Genotyping® (Innogenetics) 16 HPV (11 HR + 5 BR).

Puces ADN :

- Papillocheck® HPV screening (Greiner) : 24 HPV (18 HR + 6 BR),
- Clinical arrays HPV® (Genomica) tubes : 35 HPV (18 HR + 6 IR + 11 BR).

PCR quantitative :

- pas de kit disponible actuellement,
- prototype COBAS TaqMan (CTM) Roche, 16 HPV-HR (actuellement pour le génotypage).

Tableau 1 - Les différentes techniques sensibles basées sur l'ADN viral (commercialisées)

| | Technologie | Particularité | Nombre d'HPV détectés |
|---------------------------|--------------------------|--|-----------------------|
| Hybrid Capture 2® | Hybridation | Validé en primaire | 13 HR |
| Amplicor® | Hybridation + extraction | | 13 HR |
| Linear Array® | Génotypage + extraction | Détecte des co-infections | 37 (13 HR) |
| INNO-Lipa HPV Genotyping® | Génotypage + extraction | Largement utilisé pour études épidémiologiques | 16 (11 HR) |
| Papillocheck® | Puces ADN | Lecture par scanner | 24 (18 HR) |
| Clinical arrays HPV® | Puces ADN | Lecture par scanner | 35 (18 HR) |

Techniques basées sur l'ARNm

La molécule d'ARN directement synthétisée à partir du modèle ADN reste dans le noyau de la cellule et est traitée par un complexe enzymatique. Ce mécanisme s'appelle l'épissage : certaines séquences appelées introns sont excisées, les exons restants se relient ensuite entre eux. Il peut y avoir un mécanisme d'épissage alternatif, augmentant ainsi le nombre de possibilités d'ARNm mature. L'ARN produit est plus court, passe dans le cytoplasme et devient un ARNm. C'est le processus de la transcription.

- ARNm E6/E7 HPV-HR (type/cocktail : expression virale) :
- Pretect® HPV-Proofer (Norchip) : 5 HPV-HR (5 types),
 - Aptima® HPV Assay (Gen-Probe) : 14 HPV-HR (cocktail).

Ces techniques basées sur la révélation des transcrits posent le problème de la cellularité du prélèvement, ce qui nécessite des cytobrossettes de très bonne qualité et un milieu liquide adapté.

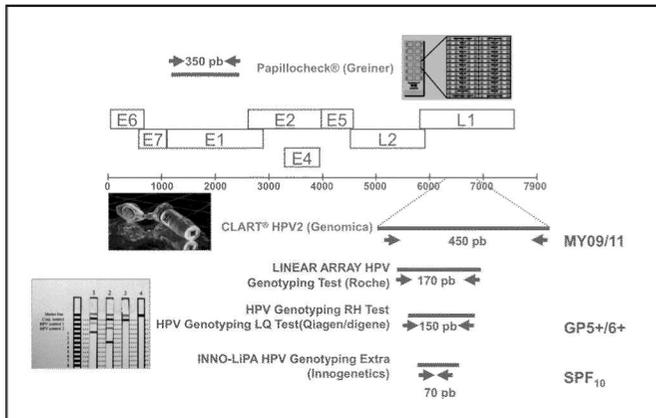
LES GÉNOTYPAGES GRÂCE AUX PCRS

La PCR est une méthode d'amplification génique *in vitro*, permettant de copier en grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN connue à partir d'une faible quantité d'acide nucléique ou d'amorces. Cette technique permet de détecter à partir d'un échantillon complexe et peu abondant d'importante quantité d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie.

Ces techniques supposent une extraction, une détection, permettent +/- un génotypage, et nécessitent des contrôles internes.

Ces techniques de PCR avec génotypage ont un intérêt indéniable dans les études épidémiologiques ; elles pourraient avoir un intérêt dans la caractérisation d'une infection persistante au-delà de 24-36 mois et dans le contrôle des traitements et celui des vaccinations.

Figure 2 - Sets d'amorces générales : ADN HPV E1 et L1

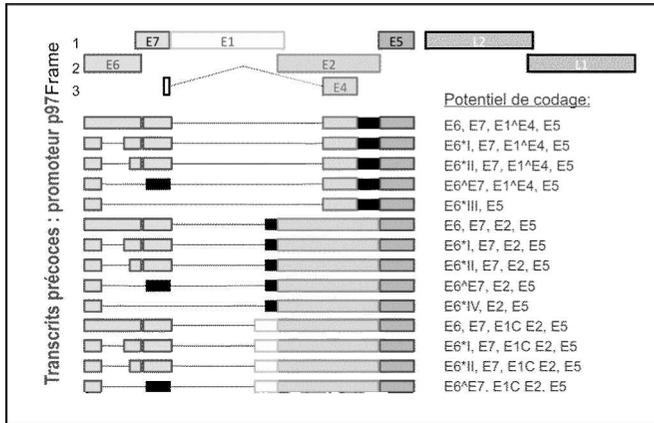


ARNm

Introduction

Les ARNm posent le problème de leur stabilité, et si l'ADN reste stable et analysable malgré une conservation à température ambiante pendant plusieurs semaines, ce n'est pas le cas des transcripts qui vont relever de conditions de stockage spécifique (conservation à + 4 °C).

Figure 3 - Complexité du transcriptome de l'HPV16



PreTect HPV Proofer®, NORCHIP

Ce test détecte la présence d'ARNm codant pour E6/E7 (régulant négativement p53 et p105Rb). L'amplification est puissante, isotherme, rapide et sélective de l'ARNm. Il est plus spécifique que les tests ADN « génériques », ce qui pourrait améliorer l'estimation du risque de progression des CIN1. Cette technique nécessite une grande qualité des échantillons, ce qui pose le problème de sa large diffusion.

APTIMA HPV Assay

Ce test combine les 3 technologies APTIMA :

- Target Capture, E6 mRNA,
- TMA, amplification - E7 mRNA,
- DKA : contrôle interne.

Il s'agit d'un test multiplex permettant la détection qualitative de 14 types d'HPV (HR et à risque intermédiaire : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) dans un simple tube. Il n'existe pas de cross-reaction avec les 5 HPV BR fréquents (6, 11, 42, 43, 44).

Le test ne va que détecter la présence ou l'absence de ces HPV sans préciser de quel ou quels types il s'agit.

MÉDECINE FACTUELLE DES APPROCHES DE GÉNOTYPAGE ET D'ARNm

Si la littérature est abondante et à forte valeur scientifique pour les tests HPV « génériques » et la PCR GP5 GP6, malheureusement rien n'est à ce jour démontré pour les autres tests.

Le génotypage

Il est démontré que les femmes positives pour les HPV 16 et 18 ont un risque augmenté de développer un CIN2+ comparées à des femmes positives à d'autres génotypes à haut risque [4]. De plus, les génotypes 18 et 45 sont étroitement liés au risque d'adénocarcinome dont le dépistage est si difficile par la cytologie cervico-utérine.

Si le dépistage viral primaire permet de dépister plus tôt des CIN2+ [2], il pose le problème de sa spécificité qui peut être pallié par le triage cytologique sur un prélèvement en phase liquide. Si les femmes doublement positives sont référées pour une colposcopie, quel est le risque réel d'une femme HPV positive à cytologie considérée comme normale ? C'est pour ces cas qui représentent 5 à 10 % des femmes dépistées [5] que le génotypage réflexe (sur la même phase liquide et sans reconvoquer la patiente), en mettant en évidence les risques évolutifs réels (HPV 16 et/ou 18 positif) permettra d'adapter l'intervalle avant un nouveau prélèvement. Il sera de quelques trimestres si le triage génotypique 16-18 est positif et de quelques semestres dans le cas contraire.

Un travail très récent de Thai [6] démontre que le génotypage 16-18-45 à partir de la technologie Hybrid Capture est sensible et très spécifique sans la lourdeur d'une PCR.

Bien entendu, même si ce travail confirme les résultats d'une étude précédente [7], la démonstration de sa réelle valeur devra se faire sur de grandes séries.

Les tests ARNm

La production d'ARNm étant le reflet d'une intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule humaine hôte, on extrapole le fait que leur présence soit la conséquence de lésions déjà installées et évoluées ou évolutives, puisque ce sont les formes épisomales du génome viral qui prédominent en cas d'absence lésionnelle [8]. Ces tests ARN pourraient améliorer le diagnostic des dysplasies [9, 10].

Ces tests détectent la présence d'ARNm codant pour E6/E7 des 5 HPV-HR les plus fréquents (ou plus : comme le kit APTIMA®, Gen-Probe), l'amplification est puissante, isotherme, rapide et sélective de l'ARN.

Tableau II - Données de littérature concernant les ARNm

| Auteur | Année | Technique | Lésion | N | ARN | ADN |
|---------------|-------|----------------|--------|------|-------|-------|
| Rose [11] | 1995 | RT-PCR | Cancer | 27 | 100 % | 100 % |
| Nakagawa [12] | 2000 | RT-PCR (E6) | CIN1 | 4 | 100 % | |
| | | | CIN2 | 5 | 100 % | |
| | | | CIN3 | 14 | 100 % | |
| | | | Cancer | 31 | 97 % | |
| Sotlar [13] | 2004 | RT-PCR (E6/E7) | N | 294 | 34 % | |
| | | | CIN1 | 56 | 76 % | |
| | | | CIN2 | 64 | 90 % | |
| | | | CIN3 | 45 | 95 % | |
| Molden [14] | 2005 | HPV-Proofer | N | 3970 | 2 % | 9 % |
| | | | ASCUS | 57 | 21 % | 47 % |
| | | | LSIL | 20 | 30 % | 75 % |
| | | | HSIL | 25 | 52 % | 64 % |
| Cattani [15] | 2009 | HPV-Proofer | N | 11 | 18 % | 100 % |
| | | | ASCUS | 40 | 20 % | |
| | | | LSIL | 106 | 48 % | |
| | | | HSIL | 66 | 86 % | |
| Dockter [16] | 2009 | Aptima® | CIN2+ | 753 | 92 % | 93 % |

Le test HPV-Proofer® a une sensibilité équivalente ou parfois à peine un peu inférieure au seuil HSIL et une spécificité significativement plus importante que les tests ADN-HPV [14, 17-19].

Il en va de même pour le test Aptima HPV Assay lorsqu'il est comparé au HC2 test [16].

La sensibilité ARN est environ moitié moins importante dans les frottis normaux, ASCUS et LSIL (mais plus spécifique) par rapport aux tests ADN, ce qui devrait permettre de moins référer ce genre d'anomalies cytologiques mineures [20].

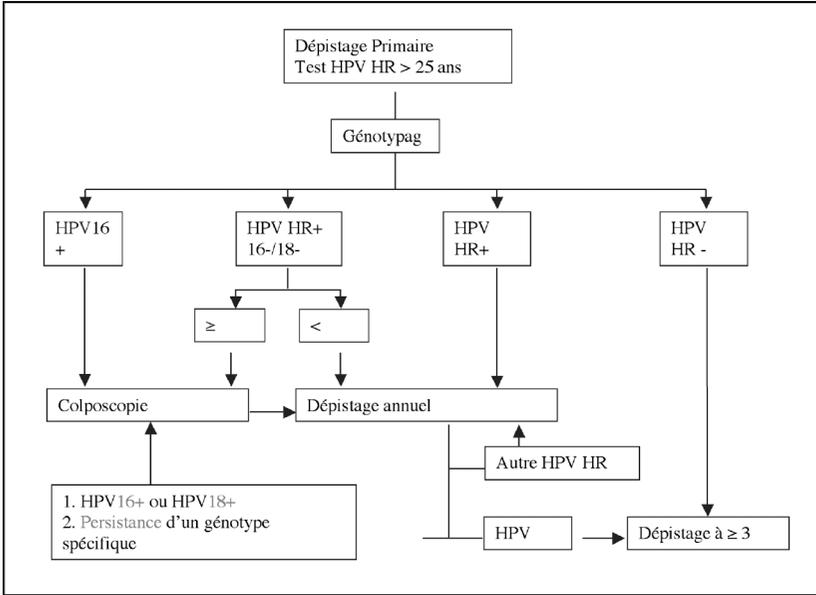
Les tests ARN pourraient également permettre de mieux sélectionner les patientes à réel risque évolutif vers les lésions pré-invasives vraies. Pour exemple, les femmes PreTect HPV Proofer® positives étaient 69,8 fois plus à risque d'être diagnostiquées avec un CIN2+ dans les 2 ans de suivi que les femmes négatives pour ce test. Les femmes positives avec le test ADN de PCR consensus étaient 5,7 fois plus à risque d'être diagnostiquées avec un CIN2+ dans les 2 ans de suivi que les femmes PCR consensus négatives [18].

On peut donc dire qu'au vu de la littérature actuelle, les tests ARN semblent plus spécifiques, même si parfois ils sont parfois moins sensibles que les tests ADN « génériques » et pourraient être le reflet d'une infection active avec persistance ou non. Mais quel est le réel intérêt de connaître cette notion s'il s'agit de génotypes non 16 et non 18 ? La question n'est pas réglée à ce jour.

Une étude compare les performances de 5 tests : HC2, Amplicor, Linear Array, Proofer test et Aptima [21]. Dans ce travail, 273 (28,6 %) des femmes avaient un CIN2+. Pour la détection des CIN2+, Hybrid Capture 2 avait une sensibilité de 99,6 %, une spécificité de 28,4 %, et une VPP de 36,1 %. Amplicor avait une sensibilité de 98,9 %, une spécificité de 21,7 %, et une VPP de 33,5 %. PreTect HPV-Proofer avait une sensibilité de 73,6 %, une spécificité de 73,1 %, et une VPP de 52,0 %. APTIMA avait une sensibilité de 95,2 %, une spécificité de 42,2 %, et une VPP de 39,9 %. Linear Array avait une sensibilité de 98,2 %, une spécificité de 32,8 %, and PPV of 37,7 %. Clinical-Arrays avait une sensibilité de 80,9 %, une spécificité de 37,1 %, et une VPP de 33,0 %. On voit donc que les niveaux de sensibilité varient d'un test à l'autre, ce qui limite l'utilisation de certains d'entre eux en première ligne de dépistage. Toutefois le test Aptima possède une bonne spécificité, ce qui pourrait lui conférer une utilité en triage des tests « génériques » positifs [22].

Contrairement aux ARNm pour lesquels les experts attendent encore des preuves de leur utilisation en clinique pour proposer clairement leur positionnement dans la prévention secondaire, certains auteurs ont proposé d'intégrer le génotypage HPV 16 et 18 en première ligne de dépistage avec ou sans la cytologie cervico-utérine (Figure 4).

Figure 4 - Proposition d'algorithme intégrant le génotypage HPV 16 et HPV 18 (d'après Castle [23])



CONCLUSION

Si l'apport de l'intégration de la recherche d'HPV par des tests ADN « génériques » dans le dépistage primaire du cancer du col est aujourd'hui soutenu par une littérature à très haut niveau de preuve, il n'en est pas de même pour le génotypage et les ARNm.

Si le génotypage apparaît aujourd'hui comme le probable futur outil de triage réflexe des tests HPV « génériques » positifs à cytologie normale, il reste à trouver à la recherche des transcrits sa place dans l'algorithme du dépistage.

En effet, l'absolue nécessité actuelle d'une excellente qualité du prélèvement complique l'utilisation des tests ARN dans leur utilisation en première ligne d'un dépistage et en particulier rend difficile leur utilisation en auto-prélèvement.

Toutes les analyses qualitatives et quantitatives (charge virale), les recherches d'expression virale, et d'autres marqueurs cellulaires

représentent des pistes sérieuses de recherche mais ne peuvent pour l'instant pas être extrapolés à une utilisation clinique.

En effet, le plus important est d'avoir une large validation clinique avec un seuil clinique pertinent et à ce jour seuls 2 tests (HC2® et la PCR GP5 GP6) remplissent ce cahier des charges.

De plus, la complexité de ces nouveaux tests avec des techniques à standardiser (extraction ADN/ARN, choix des oligosondes, CQ...), des exigences qualitatives pour le prélèvement et sa conservation, des coûts non négligeables, rendent pour l'instant leur diffusion peu aisée.

Au final, seul le triage génotypique réflexe HPV 16-18 des tests « génériques » positifs pourrait peut-être rapidement s'imposer aux cliniciens.

Bibliographie

- [1] Riethmuller D, Ramanah R, Pretet JL, Mouglin C. Integrating HPV testing for primary screening? *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2008;37:S139-51.
- [2] Bulkmans N, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade F, Boeke A, Bulk S, Voorhorst F, Verheijen R, van Groningen K, Boon M, Ruitinga W, van Ballegooijen M, Snijders P, Meijer C. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet* 2007;370:1764-72.
- [3] Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, Hingmire S, Malvi SG, Thorat R, Kothari A, Chinoy R, Kelkar R, Kane S, Desai S, Keskar VR, Rajeshwarkar R, Panse N, Dinshaw KA. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med* 2009;360:1385-94.
- [4] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1072-9.
- [5] Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006;119:1095-101.
- [6] Thai H, Rangwala S, Gay T, Keating K, McLeod S, Nazarenko I, O'Neil D, Pfister D, Loeffert D. An HPV 16, 18, and 45 genotyping test based on Hybrid Capture technology. *J Clin Virol* 2009;45:S93-7.
- [7] Nazarenko I, Kobayashi L, Giles J, Fishman C, Chen G, Lorincz A. A novel method of HPV genotyping using Hybrid Capture sample preparation method combined with GP5+/6+ PCR and multiplex detection on Luminex XMAP. *J Virol Methods* 2008;154:76-81.
- [8] Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Molecular analysis of HPV 16 E6I/E6II spliced mRNAs and correlation with the viral physical state and the grade of the cervical lesion. *J Med Virol* 2009; 81:1276-82.
- [9] Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2536-45.
- [10] Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8:405-15.
- [11] Rose BR, Thompson CH, Tattersall MH, Elliott PM, Dalrymple C, Cossart YE. Identification of E6/E7 transcription patterns in HPV 16-positive cervical cancers using the reverse transcription/polymerase chain reaction. *Gynecol Oncol* 1995;56:239-44.
- [12] Nakagawa S, Yoshikawa H, Yasugi T, Kimura M, Kawana K, Matsumoto K, Yamada M, Onda T, Taketani Y. Ubiquitous presence of E6 and E7 transcripts in human papillomavirus-positive cervical carcinomas regardless of its type. *J Med Virol* 2000;62:251-8.
- [13] Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2004;74:107-16.
- [14] Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygård JF, Hagmar B. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:367-72.
- [15] Cattani P, Siddu A, D'Onghia S, Marchetti S, Santangelo R, Vellone VG, Zannoni GF, Fadda G. RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 2009;47:2136-41.
- [16] Dockter J, Schroder A, Hill C, Guzinski L, Monsonogo J, Giachetti C. Clinical performance of the APTIMA HPV Assay for the

detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. *J Clin Virol* 2009;45:S55-61.

[17] Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence--implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol* 2004;73:65-70.

[18] Molden T, Nygård JF, Kraus I, Karlsen F, Nygård M, Skare GB, Skomedal H, Thoresen SO, Hagmar B. Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR: A 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int J Cancer* 2005;114:973-6.

[19] Kraus I, Molden T, Erno LE, Skomedal H, Karlsen F, Hagmar B. Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones. *Br J Cancer* 2004;90:1407-13.

[20] Keegan H, Mc Inerney J, Pilkington L, Grønn P, Silva I, Karlsen F, Bolger N, Logan C, Furuberg L, O'Leary J, Martin C. Comparison of

HPV detection technologies: Hybrid capture 2, PreTect HPV-Proofer and analysis of HPV DNA viral load in HPV16, HPV18 and HPV33 E6/E7 mRNA positive specimens. *J Virol Methods* 2009;155:61-6.

[21] Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, Austin J, Ho L, Terry G, Liddle S, Dina R, McCarthy J, Buckley H, Bergeron C, Soutter P, Lyons D, Cuzick J. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3033-42.

[22] Getman D, Aiyer A, Dockter J, Giachetti C, Zhang F, Ginocchio CC. Efficiency of the APTIMA HPV Assay for detection of HPV RNA and DNA targets. *J Clin Virol* 2009;45:S49-54.

[23] Castle PE. The potential utility of HPV genotyping in screening and clinical management. *J Natl Compr Canc Netw* 2008;6:83-95.