

Aus dem Institut für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand:
Univ.-Prof. Dr. W Schmahl

Arbeit angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern

Angefertigt unter der Leitung von
Priv. Doz. Dr. Peter Hillemanns

**Nachweis einer aktiven HPV-Infektion durch Proteindetektion
Vergleichsstudie eines neuen Testsystems
mit einer herkömmlichen DNA-Analyse**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Henrik Heermann
aus Essen

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. A. Fischer
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

für Pina

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	HUMANE PAPILLOMVIREN (HPV)	1
1.1.1	ALLGEMEIN	1
1.1.2	GENOMANALYSE	2
1.1.3	INFEKTIONSZYKLUS	3
1.1.4	KARZINOGENESE	6
1.1.5	KLINIK	7
1.1.6	IMPfung GEGEN HPV	10
1.2	ZERVIKALE INTRAEPITHELIALE NEOPLASIE (CIN) / ZERVIXKARZINOM	10
1.2.1	EPIDEMIOLOGIE	10
1.2.2	MORPHOLOGIE	11
1.2.3	KLASSIFIKATION	13
1.2.4	CIN: HISTORIE UND RISIKOFAKTOREN	18
1.2.5	DIAGNOSTIK UND SCREENING	20
1.2.5.1	Historie	21
1.2.5.2	Zytologie	22
1.2.5.3	Kolposkopie	25
1.2.5.4	Schwächen der derzeitigen Krebsvorsorge	28
1.2.6	DIREKTE VIRUS-NACHWEISE	30
1.2.6.1	Hybrid-Capture-Assay (HCII)	31
1.2.6.2	Polymerase-chain-reaction (PCR)	31
1.2.6.3	HPV-Screening	32
1.2.6.4	Serologie	34
1.2.7	NEUESTE BIOMARKER IN DER DIFFERENTIALDIAGNOSTIK VON HPV- ASSOZIIERTEN LÄSIONEN	37
1.3	ZIEL DER STUDIE	37
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	39
2.1	PATIENTENKOLLEKTIV	39
2.2	TESTDURCHFÜHRUNG	40
2.3	AUSWERTUNG	43

2.4 ZUSAMMENFASSUNG	43
2.5 BENÖTIGTE REAGENZIEN UND GERÄTE	43
2.6 DATENAUSWERTUNG UND STATISTIK	44
3 ERGEBNISSE	46
<hr/>	
3.1 ANALYSE DES GESAMTKOLLEKTIVS	46
3.2 ZYTOLOGIE	47
3.3 KOLPOSKOPIE	48
3.4 HISTOLOGIE	48
3.5 HPV-DNA-NACHWEIS	50
3.6 VIROACTIV-NACHWEIS	50
3.7 VERGLEICHE	51
3.7.1 VERGLEICH VIROACTIV / HCII	51
3.7.2 VIROACTIV/HCII IM VERGLEICH ZUR ZYTOLOGIE	52
3.7.3 VIROACTIV/HCII IM VERGLEICH ZUR KOLPOSKOPIE	54
3.7.4 VERGLEICH VIROACTIV/HCII MIT DER HISTOLOGIE	55
3.7.5 VERGLEICH DER VIROACTIV/HCII ERGEBNISSE SPEZIELL BEI CIN 1 BEFUNDEN	56
3.8 ALTERSVERTEILUNG DER HPV-INFESTIONEN	57
4 DISKUSSION	59
<hr/>	
4.1 EINLEITUNG	59
4.2 PATIENTENKOLLEKTIV	60
4.2.1 UNTERSUCHUNGSMETHODEN	61
4.3 ERGEBNISSE DER TEST-DATEN	63
4.3.1 VERGLEICH VIROACTIV / HCII	63
4.3.2 VIROACTIV / HCII, IM VERGLEICH ZUR ZYTOLOGIE	64
4.3.3 VIROACTIV/HCII, IM VERGLEICH ZUR KOLPOSKOPIE	66
4.3.4 VIROACTIV/HCII, IM VERGLEICH ZUR HISTOLOGIE	68
4.3.5 VERGLEICH DER VIROACTIV/HCII ERGEBNISSE SPEZIELL BEI CIN 1 BEFUNDEN	69
4.4 ALTERSVERTEILUNG DER HPV-INFESTIONEN	70
4.5 VERGLEICH MIT ANDEREN STUDIEN	71

5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	SUMMARY	74
7	VERZEICHNISSE	76
7.1	LITERATURVERZEICHNIS	76
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	90
7.3	TABELLENVERZEICHNIS	92
7.4	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
8	LEBENS LAUF	98
9	DANKSAGUNG	99

1 Einleitung

1.1 Humane Papillomviren (HPV)

1.1.1 Allgemein

Das Humane Papillomvirus gehört zur Familie der Papovaviridae, welche die Genera Papillomavirus und Polyomavirus umfasst.

Der Namen PAPOVA wurde aus den Anfangsbuchstaben dreier unterschiedlicher Vertreter gebildet; Papilloma-Polyoma-Vacuolating-Virus. Papilla (lat.) bedeutet Warze, die Nachsilbe –oma (griech.) Tumor; poly (griech.) –oma entspricht demnach “viele Tumoren”.

Medizinische Bedeutung haben aus dieser Familie nur die Papillomviren (Gedek et al., 1993).

Papillomviren sind ca. 55 nm große Viruspartikel. Sie bestehen aus einer Proteinhülle in Form eines ikosaedrischen Kapsids mit 72 Kapsomeren, die von zwei Strukturproteinen L1 und L2 gebildet werden. Innerhalb dieses Kapsids befindet sich ein doppelsträngiges, zirkuläres, etwa 8000 Basenpaare langes Molekül, das virale Genom.

Im Genomaufbau zeigen alle Papillomviren die gleiche Struktur, jedoch werden sie nach ihrer DNA - Sequenz eingeteilt. Mittlerweile sind mehr als 150 verschiedene humane Papillomviren bekannt, ihre Bezeichnung erfolgt numerisch fortlaufend.

Entsprechend ihrem Epithelotropismus lassen sie sich in drei Gruppen gliedern:

- mukokutane (Warzenbildung) (HPV 1 – 4 u.a.),
- Epidermodysplasie assoziierte (Kutane Neoplasien HPV 5, 8, 9 u.a.)
- anogenitale (Kondylome, Anal- und Zervixkarzinome HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33 u.a.)

Papillomviren haben eine weltweite Verbreitung. Die Infektion mit diesen Viren ist weitgehend organspezifisch, das heißt, betroffen sein kann das Epithel der Haut, der Larynx-, Zervix-, Penis- oder Analschleimhaut. Zudem ist die Infektion mit den verschiedenen Virustypen artspezifisch, d.h. die Ausbreitung der Infektion erfolgt nur innerhalb einer Spezies (z.B. Hund, Katze oder Mensch).

1.1.2 Genomanalyse

Das HPV besteht aus einem 8 Kilobasen großen, 500kD schweren, ringförmigen Genom, auf dem sämtliche Gene des Virus kodiert sind. Die regulatorischen und strukturellen Funktionen der durch die Gene kodierten Proteine sind größtenteils bekannt. Diese Proteine werden nach ihren Expressionsphasen in frühe (early genes; E1-E8) und späte (late genes; L1, L2) Gene unterteilt. Die Proteine der frühen Gene (ca. 4500 Basenpaare) besitzen unter anderem regulatorische Funktionen und nehmen Einfluß auf das menschliche Zellwachstum. Die E6- und E7-Genprodukte haben transformierende Eigenschaften und sind für die onkogene Potenz insbesondere der Virustypen 16 und 18 verantwortlich.

Die Strukturproteine L1 und L2, gebildet aus den late genes (ca. 2500 Basenpaare), werden im Rahmen der aktiven Infektion synthetisiert und bilden die eigentliche Virushülle aus. Sie sind die Bausteine, aus denen das Virus aufgebaut ist und werden auch Kapsid oder Hüllproteine (Minor- und Majorkapsidprotein) genannt. Innerhalb der Proteinsequenzen von L1 gibt es Bereiche, die bei allen bekannten Papillomviren sehr ähnlich (homolog) sind. Daneben existieren Strukturen, die für jeden Typ individuell und somit typspezifisch sind. Durch diese Bereiche innerhalb der Proteinsequenz ist eine genaue Einteilung und Zuordnung der einzelnen HPV-Typen möglich (McMurray et al., 2001). Siehe auch Abbildung 1.

Die Kapsidproteine L1 und L2 werden im Zytoplasma der Wirtszelle synthetisiert. L2 wird in den Kern in spezielle Regionen, sogenannte PODs transportiert und rekrutiert im folgenden L1 sowie E2, an das die Virus-DNA gebunden ist, ebenfalls in diese Regionen. Daraufhin erfolgt das Virus-Assembly und es werden reife Viren gebildet (Day et al., 1998). Der Nachweis des Kapsidproteins L1 erlaubt daher die Aussage, dass das Virus eine produktive Phase durchläuft (Flores et al., 2000). Reife, infektiöse Viren werden von der infizierten Zelle abgegeben, und die Infektion breitet sich aus. Die Viruslast wird erhöht (Josefsson et al., 2000; McMurray et al., 2001; Ylitalo et al., 2000).

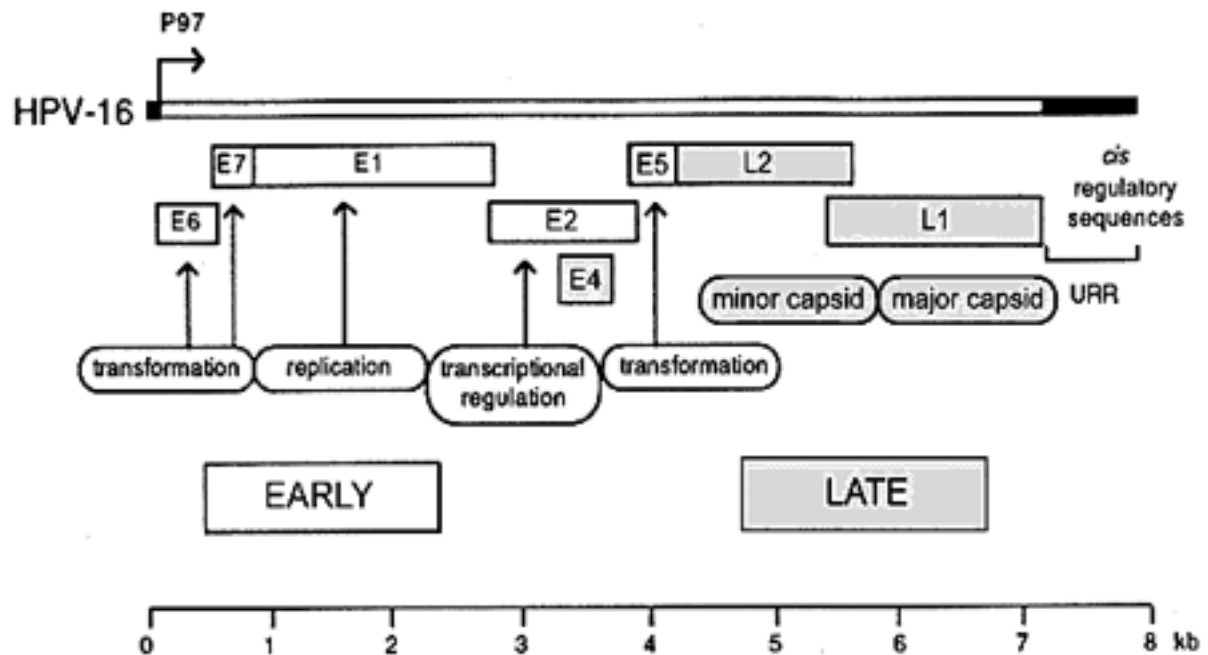


Abbildung 1: Schematische Organisation (linearisiert) des Genoms des Humanen Papillomvirus Typ 16. Mit dem Buchstaben E sind Genprodukte der sogenannten frühen (Early) Gene gekennzeichnet, L steht für die Produkte der späten (Late) Gene. Die ovalen Kästchen verweisen auf die Funktion der jeweiligen Gene. Die aufgetragene Skala am unteren Rand der Darstellung zeigt die Größe der einzelnen Abschnitte in Kilobasen (kb). (nach McMurray et al., 2001).

1.1.3 Infektionszyklus

Bei der Infektion mit dem Humanen Papillomvirus handelt es sich um eine Kontaktinfektion. Es gibt eine Vielzahl von klinischen Erscheinungen, die sehr vom Virustyp, dem betroffenen Gewebe und der Resistenzsituation des befallenen Organismus abhängen.

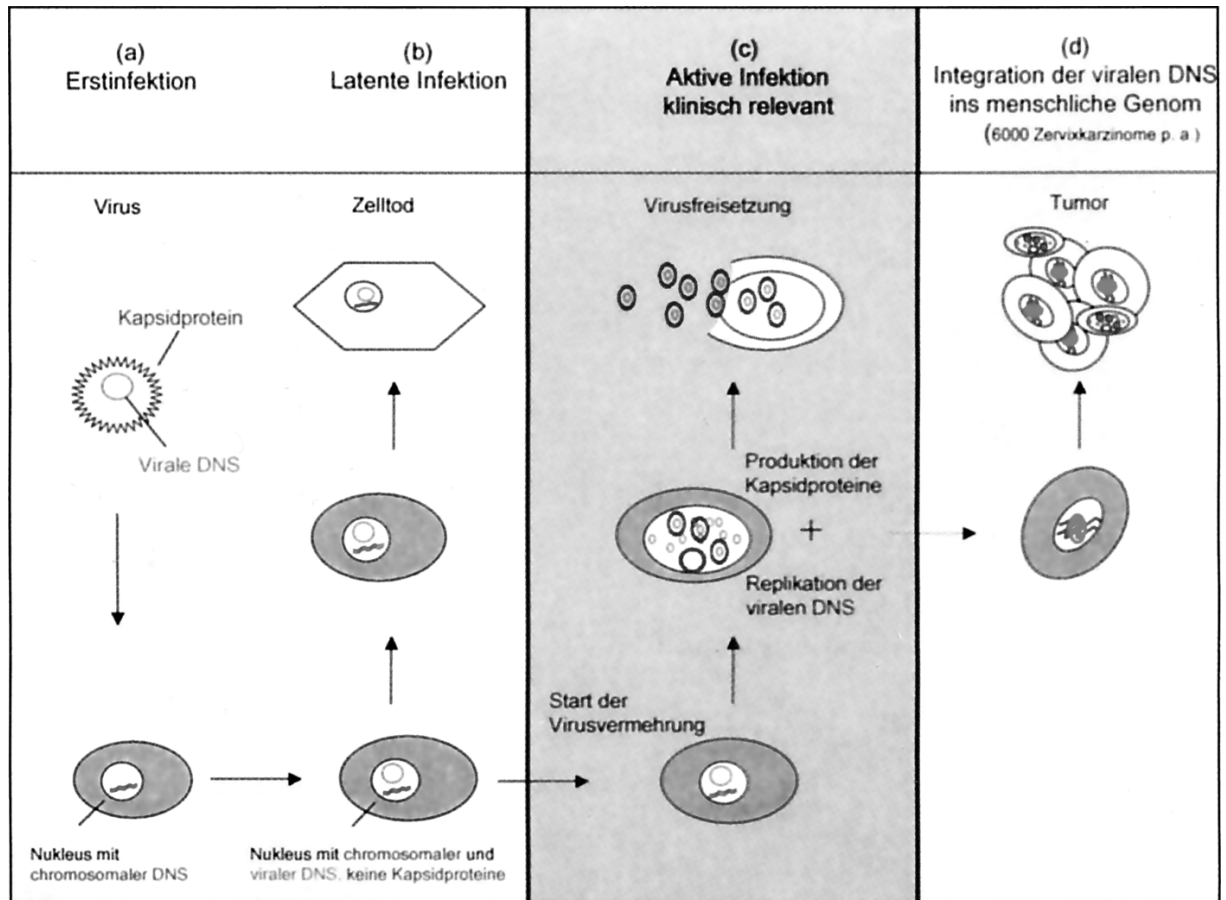


Abbildung 2: Infektionszyklus des humanpathogenen Papillomvirus (HPV, vereinfacht nach McMurray)

a) Erstinfektion einer humanen Zelle durch HPV.

b) Latente Infektion. Die Erbinformation wird von der Mutterzelle an die Tochterzelle übertragen. Der Wirt ist Virusträger.

c) Aktive Infektion mit klinischer Relevanz. Es erfolgt die Virusvermehrung durch Replikation der viralen DNA und Produktion der Kapsidproteine L1 und L2. Im letzten Stadium erfolgt die Freisetzung des Virus mit Neuinfektion der benachbarten Zellen. Die Anzahl der infizierten Zellen wird erhöht und die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Integration der viralen DNA in chromosomale DNA vergrößert.

d) Integration und Bildung von Präkanzerosen.

Viren können sich nur innerhalb von Zellen vermehren, da sie auf den Replikationszyklus der zelleigenen DNA angewiesen sind. Sie erkennen ihre spezifischen Zielzellen durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Papillomviren

dringen durch Mikroläsionen in das Gewebe ein und infizieren dort nur die Basalzellen. Hierbei bleiben die Proteine der Virushülle auf der Zelloberfläche zurück oder werden in der Zelle abgebaut. Nach der Erstinfektion verbleibt das Virus über einen längeren Zeitraum in der Zelle. Die infizierte Zelle enthält zwar die Virusgene, aber es werden keine Viren gebildet und somit keine Virusgene exprimiert. Diese als "latente Infektion" bezeichnete, klinisch nicht relevante Phase kann Monate bis Jahre andauern (Abb. 2b).

In anderen Fällen kommt es zunächst zu einer primären Virusvermehrung, die jedoch nur kurz andauert, da sie vom Immunsystem in Schach gehalten wird. Man spricht dann von einer nicht-apparenten, oder subklinischen Infektion, da sie ohne Krankheitssymptome einhergeht (Streeck und Hilfich 2000).

Noch nicht ganz geklärt sind die Gründe für den Übergang einer latenten in eine aktive, klinisch relevante Infektion. In diesem Zustand vermehrt sich das Virus, wird freigesetzt und infiziert neue Zellen. Während dieser infektiösen Phase erhöht sich die Viruslast des Patienten und es kommt zu den klinischen Symptomen eines akuten viralen Infektes wie in Abb. 2c dargestellt ist (Neumann und Kohlhoff 2001).

Die Integration der viralen DNA ins menschliche Genom, und damit eine mögliche tumoröse Entartung der Zelle, ist ein eher seltenes Ereignis und gipfelt jährlich in ca. 6000 Fällen eines Zervixkarzinoms in Deutschland (Abb. 2d).

Bei den HPV-Infektionen überwiegen die latenten und subklinischen Verläufe, welche jedoch in der Praxis trotz der hohen Prävalenz nur eine untergeordnete Rolle spielen. Klinisch relevant sind dagegen Manifestationen als Warzen der verhornenden Haut, Condylomata acuminata, sowie Dysplasien und Vagina- und Zervixkarzinom.

So stellten Ho et al. (2001) fest, dass bei 80% der Infizierten nach einem Zeitraum von ca. 12 Monaten das HP-Virus molekularbiologisch nicht mehr nachweisbar war. Bleibt bei den verbleibenden 20% der Patientinnen eine HPV-Infektion im unteren Genitaltrakt für mehrere Jahre bestehen, können sich Krebsvorstufen wie Dysplasien oder intraepitheliale Neoplasien entwickeln. Allerdings führen nur weniger als 1% der persistierenden Infektionen nach einer Zeitdauer von durchschnittlich 15 Jahren zum Karzinom (Solomon et al., 2001).

Da nur wenige der Infizierten an einem Zervixkarzinom erkranken, sind neben HPV noch andere Kofaktoren von Bedeutung. Neben Immunsuppression, HIV-Infektion, Rauchen, Chlamydien- und Herpesinfektionen scheinen vor allem genetische Faktoren eine Rolle zu spielen. Diese Faktoren schwächen das Immunsystem, und ermöglichen somit keine Unterdrückung oder Elimination der HPV-Infektion.

Die genitalen HPV-Infektionen zählen zu den häufigsten sexuell übertragenen Erkrankungen, die vor allem junge Frauen im frühen reproduktiven Alter betreffen. Der Häufigkeitsgipfel für nachweisbare HPV-Infektionen liegt, abhängig vom Sexualleben, im Alter zwischen 20 und 25 Jahren bei 30 bis 50%. Die Prävalenz nimmt mit zunehmendem Alter deutlich ab und wird in den Altersstufen von 35 bis 50 Jahren mit 3-10% angegeben (Pfister 1997; Schneider et al., 2001; Ho et al., 2001).

1.1.4 Karzinogenese

Die Tumorentwicklung ist nach Cotran et al. (1993) in eine Abfolge mehrerer Schritte zu unterteilen. Initial kommt es durch die Einwirkung eines Karzinogens zu einer Transformation einer einzelnen Zelle, welche in Folge über einen Wachstumsvorsprung verfügt, und über Jahre zu einer lokalen Zellproliferation führt. Durch die Einwirkung weiterer Karzinogene begünstigt, entstehen aus der monoklonalen Formation transformierter Zellen weitere Varianten dieser Zelle. Als induzierende, mutagene Faktoren kommt eine Vielzahl von Verbindungen in Frage. Dazu zählen insbesondere poly- und heterozyklische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine, Azofarbstoffe, ferner energiereiche Strahlung (ionisierende Strahlung, UV-Licht) sowie Viren (DNA-Viren: Hepatitis-B-Virus, HPV, EB-Virus).

Diese Veränderungen führen zunehmend zu einer genetischen Instabilität. So lässt sich auch die deutliche Heterogenität der Tumorzellen in ihren verschiedenen klinischen Stadien erklären.

Das Humane Papillomvirus kann eine initiale Änderung im Proliferationsverhalten von Plattenepithelien hervorrufen. Infolge kleinster Läsionen der äußeren Hornschicht dringt das Virus bei einer Kontaktinfektion vermutlich durch Endozytose in die basale Hautschicht der undifferenzierten Epithelzellen ein. Durch diese

Infektion werden Expression und Vermehrung viraler Proteine in den Basalzellen initiiert. Das virale Gen E6, welches das gleichnamige Protein E6 kodiert, wird mit Zunahme der Differenzierung der Epithelzellen vermehrt produziert. Dieses bindet und inaktiviert das zelluläre Suppressor-Protein p53 und führt dazu, dass die Wachstumshemmung in den HPV befallenen Zellen ausbleibt (Gross et al., 1997). Wagner (1999) bezeichnet Krebs als eine genetische Erkrankung. Das genetisch programmierte, physiologische Gleichgewicht zwischen Zelltod (Apoptose) und Zellerneuerungen (Regeneration) ist infolge von Mutationen gestört. Wachstumsfaktoren wie EGF: epidermal growth factor, PDGF: plated derived growth factor und andere überwiegen gegenüber den Antagonisten mit hemmender Funktion, wie Rb: Retinoblastomogen und p53, einem zellulären Tumorsuppressor. Zur Folge hat dies, dass das Epithel von einem geordneten in ein autonomes Wachstum übergeht. Im Falle des Plattenepithels kommt es zu einer lokal stark gesteigerten Proliferation, woraufhin sich Warzen oder Papillome bilden.

1.1.5 Klinik

Die Infektion durch Papillomviren kann sowohl benigne, als auch maligne Tumoren der Haut und der Schleimhäute hervorrufen. Die lokalen Zellproliferationen der infizierten Bereiche bilden sich jedoch meist spontan wieder zurück. Dabei handelt es sich um Warzen, die an Händen, Beinen, Füßen und im Gesicht vorkommen. Bei diesen Warzen sind meist die HPV-Typen 1-4, 7, 10, 26-29, 41, 48, 60, 63 sowie 65 assoziiert (Modrow et al., 1997). All diese Entartungen sind gutartiger Natur und daher nicht gefährlich.

Ebenfalls nicht bösartig, jedoch nur bei Patienten mit genetischer Disposition und geschwächtem Immunsystem, tritt die Epidermodysplasia verruciformis mit Ganzkörperbefall auf. Bei dieser Form sind vorwiegend HPV-Typ 5 und 8, seltener HPV 14, 17, 20 und 47 nachgewiesen worden. Bei dieser Warzenform ist jedoch unter UV-Licht-Exposition eine maligne Entartung der sonst benignen Läsionen bekannt (Villiers 1988).

Die HPV-Typen 6 und 11 kommen meist bei Läsionen in den Schleimhäuten vor. In der Regel gutartig sind die Larynx-Papillome, die bei Kindern auftreten. Im anogenitalen Bereich verursachen diese Typen Condylomata acuminata, welche selten in eine maligne Form übergehen (siehe Tabelle 1).

klinisches Bild	Besonderheiten	HPV - Typen
plantare Warzen	einzelne Warzen, bevorzugt an Fußsohle; gutartig	1, 4
gewöhnliche Warzen	gehäufte Warzenbildung, meist an den Händen; gutartig	1, 2, 4, 26, 28, 29, 41, 48, 60, 63, 65
flache Warzen	gehäufte Warzenbildung, an Armen, Beinen, im Gesicht; gutartig	3, 10, 27
Metzgerwarzen	gewöhnliche Warzen an Händen von Metzgern, Schlächtern etc.; gutartig	7
juvenile Larynx-Papillome	meist bei Kindern, starkes Wachstum; gutartig	6, 11
fokale, epitheliale Hyperplasie	Läsionen im Mundbereich; gutartig	13, 32
Condylomata acuminata	Exophytische Läsionen der Haut und Schleimhaut; meist gutartig, gehen selten in maligne Formen über	6, 11, 40, 42-44
flache zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN 1, CIN 2)	Meist gutartig, können in maligne Formen übergehen	6, 11, 16, 18, 30, 31, 33-35, 39, 40, 42-45, 51, 52, 56-59, 61, 64, 66-68
Zervixkarzinom, zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN 3)	Präkanzerose, invasiver Tumor	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 62, 66

Epidermodysplasia verruciformis	gehäufte Warzenbildung; meist bösartig	5, 8, 14, 17, 20, 47
Epidermodysplasia verruciformis (bei immunsupprimierten Personen)	gehäufte Warzenbildung; meist gutartig	3, 9, 12, 19, 21-25, 36-38, 46, 47, 49, 50
bowenoide Papulose/M.Bowen, vulväre intraepitheliale Neoplasien (VIN I-III)	pigmentierte Hautläsionen; bösartig	16,18

Tabelle 1: Hautläsionen und Tumorerkrankungen und die HPV-Typen, die sie bevorzugt verursachen, nach Modrow und Falke, 1997

Gerade die anogenitalen Läsionen sind wegen ihrer Tendenz zu tumorösen Entartungen von besonderer Bedeutung. Es kommen mehr als 35 HPV-Typen bei anogenital lokalisierten Läsionen vor. Mehr als 20 HPV-Typen von diesen sind mit dem invasiven Zervixkarzinom assoziiert (Bernard et al., 1994).

Ein geringes onkogenes Risiko weisen die Typen 6, 11, 30, 42, 43 und 44 auf. Sie werden hauptsächlich bei gutartigen Veränderungen wie der Condylomata acuminata nachgewiesen. HPV 6 und 11 kommen bei 95% der anogenitalen Warzen vor, jedoch fast nie beim invasiven Karzinom der Zervix uteri (Gross 1997). Dafür sind sie bei Tumoren vom Buschke-Löwenstein-Typ nachgewiesen worden, welcher ausgehend von einer Condylomata acuminata mit invasivem, destruierendem Wachstum, Fistelbildung und möglichem Übergang in ein Plattenepithelkarzinom an der Vulva und am Genitale des Mannes vorkommt (Lehn et al., 1984).

Ein mäßiges onkogenes Risiko wird den Typen 31, 33, 35, 39, 51, 52, 58 und 61 zugeschrieben; HPV 16, 18, 45 und 56 dagegen ein hohes. Diese Viren lassen sich sowohl in leichten, wie auch mäßig bis schweren Dysplasien (Zervikale intraepitheliale Neoplasien: CIN 1-3) sowie in invasiven Karzinomen von Zervix-, Vulva-, Penis- und bestimmten Analregionen nachweisen. Mehrere Studien belegen,

dass HPV-Infektionen einen wesentlichen Faktor in der Entwicklung des Gebärmutterhalskrebses darstellen. Besonders die HPV-Typen 16 und 18 sind mit einem invasiven Zervixkarzinom assoziiert (Lorincz et al., 1992).

1.1.6 Impfung gegen HPV

In einer ersten großen Studie wurde überzeugend die Wirksamkeit eines Impfstoffs gegen HPV-16 Infektionen gezeigt (Koutsky et al., 2002). Weitere Impfstoffe mit unterschiedlichen, sowohl präventiven als auch therapeutischen Ansätzen befinden sich noch in der frühen Phasen der Entwicklung. Bis zur Zulassung der ersten HPV-Impfstoffe werden noch mindestens fünf Jahre vergehen. Der Effekt einer HPV-Immunisierung auf die Inzidenz von Zervixkarzinomen wird vermutlich erst in Jahrzehnten zu erwarten sein. Auch bei Verfügbarkeit einer HPV-Vakzine bleibt daher ein effektives Früherkennungsprogramm auf unabsehbare Zeit unverzichtbar (Grubert und Friese 2003).

1.2 Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) / Zervixkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Die Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) stellte 1990 die Neoplasien des Gebärmutterhalses als zweithäufigste Tumorerkrankung der Frau nach Brustkrebs fest.

In den Entwicklungsländern ist das Zervixkarzinom der häufigste Tumor der Frau und die Inzidenz ist hier mehr als doppelt so hoch, wie in den Industrieländern. Weltweit erkranken jährlich rund 500.000 Frauen, in etwa 203.000 Fällen führt die Erkrankung zum Tod. Besonders in den Entwicklungsländern, aus denen über 79% dieser Todesfälle stammen, stellt dieser Tumor ein massives Problem dar. Nach einer HIV-

Infektion birgt der Gebärmutterhalskrebs das zweithöchste Mortalitätsrisiko in den afrikanischen Ländern südlich der Sahara (Pisani et al., 1993).

In Deutschland steht das Zervixkarzinom bei Frauen mittlerweile an achter Stelle in der Rangfolge der Inzidenz (nach Brustkrebs, Darmkrebs, Leukämien und Lymphomen, Tumoren des Gebärmutterkörpers, Magenkrebs, Bronchialkarzinom und Ovarialkarzinom). Die Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister und das Robert Koch Institut geben 7.017 Neuerkrankungsfälle für das Jahr 1998 an, das sind 3,9% aller weiblichen Krebserkrankungen.

Bezüglich der Mortalität gehört das Zervixkarzinom in Deutschland nicht mehr zu den acht häufigsten Krebstodesursachen. Für das Jahr 1999 wird von 2.020 Sterbefällen aufgrund eines Zervixkarzinoms berichtet. Der Anteil an der tumorbedingten Mortalität beträgt knapp 2% (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister, 2002).

Die Einführung des zytologischen Krebsvorsorgeprogrammes in Deutschland und anderen Ländern hat bis zur Mitte der 80iger Jahre zu einem deutlichen Abnehmen der Inzidenz des Zervixkarzinoms geführt. Leider konnte seitdem keine weitere Senkung erzielt werden.

Die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) des weiblichen Genitale ist die Präkanzerose, die mit einer Latenz von 10 Jahren und mehr in ein invasives Plattenepithelkarzinom übergehen kann. Die Prävalenz dieser Vorstufen zeigt in Westeuropa und den USA eine ständige Zunahme in den letzten zwei Dekaden und liegt bei etwa 3-5% (Bosch et al., 1995; Soost 1991). Frauen im reproduktiven Alter zwischen 25 und 40 Jahren sind vorwiegend betroffen (Hillemanns et al., 1997).

1.2.2 Morphologie

Die Tumore der Zervix uteri entstehen zu 85% aus Plattenepithelkarzinomen. Dann folgen Adenokarzinome und andere epitheliale Läsionen.

Das betroffene Plattenepithel befindet sich an der Portio uteri und geht dort von einem mehrreihigen nichtverhornenden Plattenepithel im Zervixkanal in ein

Zylinderepithel über. Dieser Bereich wird „Transformationszone“ genannt (Soost 1990, siehe Abbildung 3).

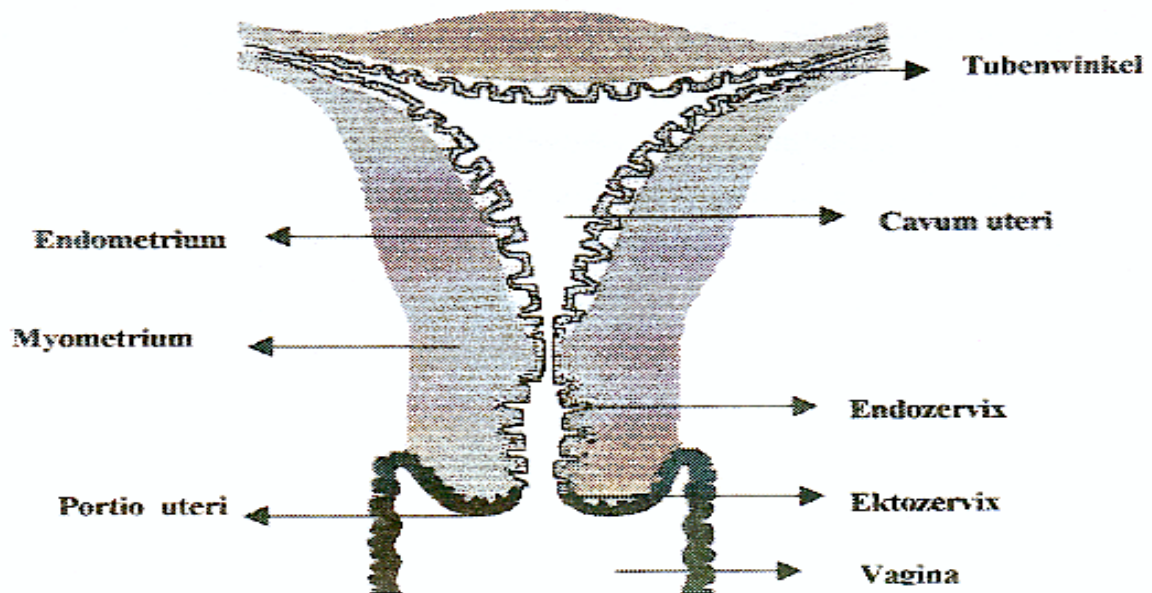


Abbildung 3: Anatomie der Zervix uteri (mod. nach Jacues 1993)

schwarz: Plattenepithel, hellgrau: Zylinderepithel, Übergang: Transformationszone

Diese Epithelgrenzlinie ist während der Geschlechtsreife im Bereich der Portio vaginalis uteri vorzufinden und daher gut per Spekulum zu untersuchen. Während der Menopause verlagert sich diese Grenzlinie nach endozervikal und ist für den Untersucher schlecht einsehbar. Durch ihre erhöhte Vulnerabilität auf chemische und mechanische Reize ist diese Transformationszone prädisponiert für neoplastische Zellveränderungen (siehe Abb. 4).

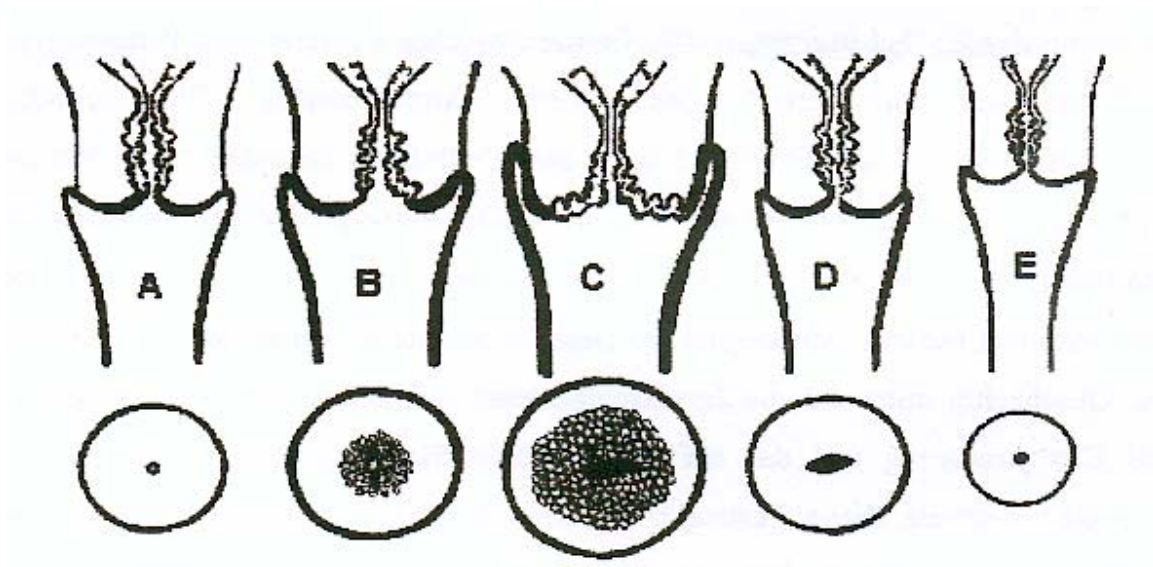


Abbildung 4: Lokalisation der Zylinder-Plattenepithelgrenze in Abhängigkeit vom Lebensalter: (A) Kindheit, (B) Pubertät, (C) Geschlechtsreife, (D) Postmenopause (E) Senium (Jacues 1993)

1.2.3 Klassifikation

Als „Dysplasie“ wird ein zunehmender Verlust der Zelldifferenzierung in einem sonst entdifferenzierten Epithelaufbau bezeichnet. Es treten atypische Veränderungen des Plattenepithels oder des metaplastischen Epithels an der Oberfläche der Zervix und im Bereich der Zervixdrüsen auf. Je nach Ausmaß des veränderten Epithelaufbaus, der Zellatypie und Mitosen wird zwischen verschiedenen Dysplasiestufen unterschieden (Soost et al., 1990).

Für eine stadienadaptierte Therapie, die Vergleichbarkeit von Tumoren und für wissenschaftliche Untersuchungszwecke ist eine exakte Stadieneinteilung und Nomenklatur eines Tumors von eminenter Bedeutung (Hillemanns 1969).

Aufgrund neuerer patho-biologischer Erkenntnisse über die Zervixdysplasie wurde die Nomenklatur mehrmals verändert. Die am weitesten verbreiteten Klassifikationen stellen die CIN (zervikale intraepitheliale Neoplasie) und die Dysplasie-Carzinoma-in-

situ-Klassifikation dar, die beide auch im deutschsprachigen Raum verwendet werden (Soost et al., 1991).

Letztere, auch Bethesda-Nomenklatur genannt, die in den USA seit 1998 für zytologische Befundung verwendet wird, reduziert die Einteilung auf nur zwei Dysplasiekategorien („low-grade“ versus „high-grade squamosus intraepitheliale lesion“). Die low-grade squamosus intraepithelial lesion entspricht der CIN 1 und die high-grade squamosus intraepithelial lesion entspricht der CIN 2 und CIN 3. Eine Einteilung in nur zwei Gruppen stellt nicht die selben hohen Anforderungen an den Untersucher, was möglicherweise zu Nachlässigkeiten führen kann (Jacues 1993).

Bei der Bethesda–Nomenklatur ist die Gefahr unnötiger Behandlungen offensichtlich, da diagnostisch und prognostisch wertvolle Informationen einer dreistufigen Klassifikation verloren gehen und die Therapieschwelle, durch die Subsummierung von CIN 2 und CIN 3 in die high-grade squamosus intraepithelial lesion gesenkt wird (Hillemanns et al., 1997).

WHO-Nomenklatur	Münchner Nomenklatur II (Zytologie)	Bethesda-System (Zytologie / Histologie)
CIN 1 (leichte Dysplasie)	Pap III D	low - grade SIL
CIN 2 (mäßige Dysplasie)	Pap III D	high - grade SIL
CIN 3 (schwere Dysplasie/ Carcinoma in situ)	Pap IV a	high - grade SIL

Tabelle 2: Nomenklaturen der CIN (nach Hillemanns et al., 1997)

SIL= Squamosus intraepithelial lesion

Die Exfoliativzytologie der Zervix uteri wird im deutschsprachigen Raum nach der Münchener Nomenklatur II klassifiziert. Diese wurde 1975 von der Deutschen Gesellschaft für Zytologie verabschiedet, die gleichzeitig auch Empfehlungen für das jeweilige weitere Vorgehen enthält. Die Münchener Nomenklatur II, die 1989 auf dem 16. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Zytologie vorgeschlagen wurde, stellt

eine Ergänzung und Differenzierung der Münchener Nomenklatur von 1975 dar und wurde 1997 erneut modifiziert. Sie ermöglicht eine Wiedergabe der Befunde sowohl in konventioneller Weise als auch unter Verwendung eines entsprechenden Codes, über Computerausdruck. Dabei ist die textliche Beschreibung und eine Wertung aller zytologischen Befunde obligatorisch (Ziegenbalg 1998, siehe Tabelle 3).

Gruppe	Zytologischer Befund	Empfehlung
I	Normales Zellbild	Kontrolle in einem Jahr
II	Entzündliche, degenerative oder metaplastische Veränderung, Hyper- und Parakeratosen	Eventuell zytologische Kontrolle
III	Unklarer Befund: -schwere entzündliche oder degenerative Veränderungen, die eine Beurteilung zwischen gut- und bösartig nicht zulassen -auffällige Drüsenzellen, die eine Beurteilung zwischen gut und bösartig nicht zulassen	Je nach klinischem und kolposkopischem Befund kurzfristige zytologische Kontrolle oder histologische Abklärung
IIID	Zellen einer Dysplasie leichten bis mäßigen Grades	Kolposkopisch-zytologische Kontrollen in 3 Monaten
IVa	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ	Kolposkopisch-zytologische Kontrolle und histologische Abklärung
IVb	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carzinoma in situ, invasives Karzinom nicht auszuschließen	
V	Zellen eines invasiven Zervixkarzinoms oder eines Tumors nicht auszuschließen	
0	Technisch unbrauchbar	Sofortige Klärung

Tabelle 3: Münchener Nomenklatur II für gynäkologische Zytodiagnostik

Als CIN 1 werden leichte Dysplasien mit Reifungsstörungen des basalen Drittels der Epithelschicht und normaler Differenzierung der oberflächlichen Schichten des Plattenepithels bezeichnet. CIN 2, die eine mäßige Dysplasie darstellt, weist höchstens eine zu 2/3 betroffene Basalschicht auf, wohingegen bei der schweren Dysplasie der CIN 3 fast alle drei Schichten entdifferenziert sind. Das Carzinoma in situ fällt unter den Grad 3 der CIN-Klassifikation, jedoch zeigt sich bei dieser Läsion eine Differenzierungsstörung von Basalschicht über alle Schichten des Epithels. Der Übergang von CIN zum invasiven Karzinom ist mit dem Durchbrechen der Basalmembran zu erklären (Soost et al., 1990, siehe Tabelle 5)

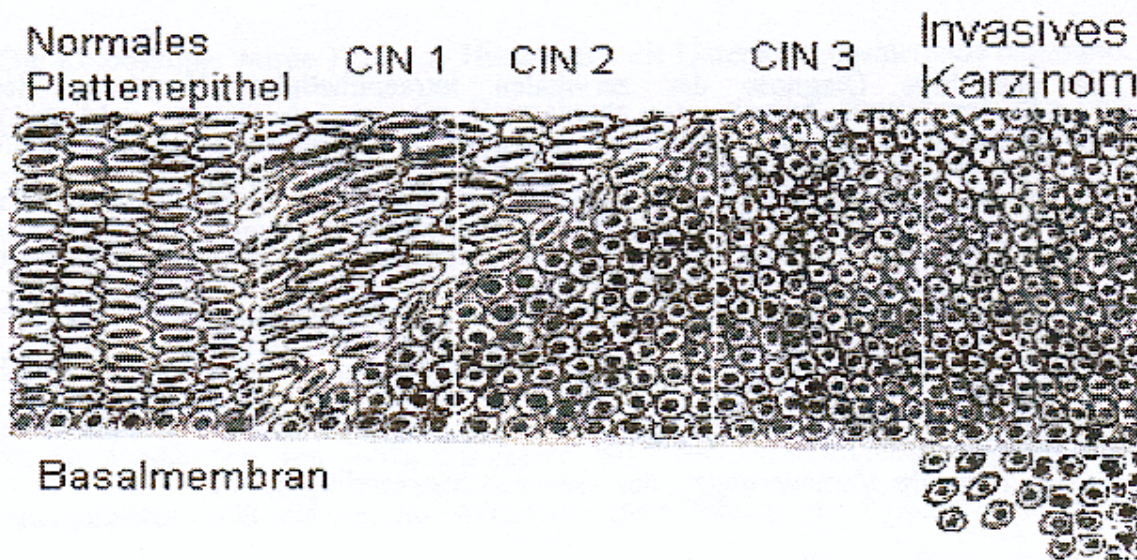


Abbildung 5: Das histologische Schema der zervikalen Neoplasien (Hilgarth et al., 1996)

Die Entwicklung des Zervixkarzinoms weist einen, oftmals über Jahre dauernden Verlauf auf. Der Gebärmutterhalskrebs hat meist seinen Ursprung in einer leichten Dysplasie (CIN 1) und entwickelt sich, mit einer unterschiedlich langen Latenzzeit über viele Jahre zu einem invasiv wachsenden Plattenepithelkarzinom (Johnson et al., 1968).

Barron und Richart stellten 1969 bei einer Studie mit 557 Verlaufsfällen eines Carcinoma in situ mittlere Progressionszeiten für leichte Dysplasien von sechs Jahren, für mäßige Dysplasien von drei Jahren und für schwere Dysplasien von nur

einem Jahr fest. Die mittlere Progressionszeit eines Carcinoma in situ bis zum invasiven Zervixkarzinom dauert ca. 10 Jahre.

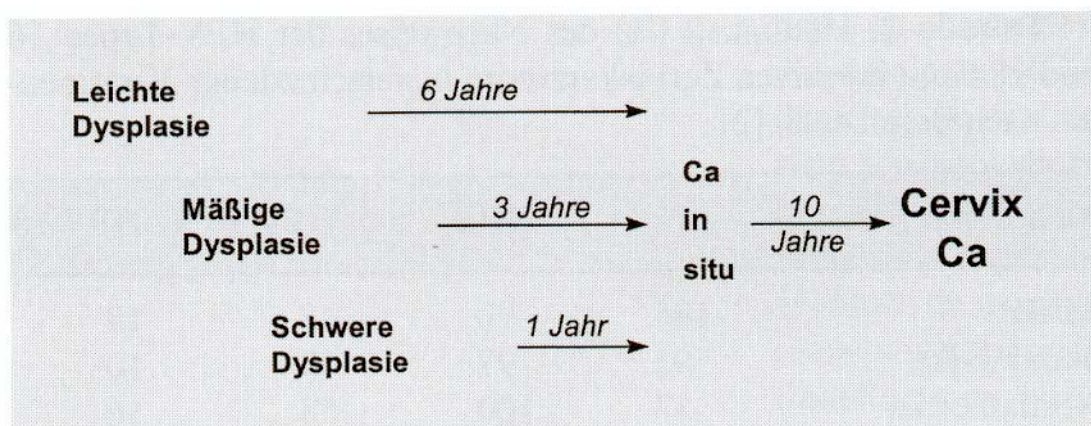


Abbildung 6: Mittlere Progressionszeiten der Dysplasie bis zum invasiven Zervixkarzinom (Barron und Richart 1969 und 1970)

Dieses Modell der kontinuierlichen Entwicklung der Dysplasie über drei Schweregrade bis hin zum invasiven Zervixkarzinom wird jedoch von einigen Autoren bezweifelt (Koss 1992; Burghardt 1973; Holzer und Pickel 1975; Kiviat et al., 1992). Eine De-Novo-Entstehung der höhergradigen Dysplasie (CIN 2 oder CIN 3) ist möglich, teilweise in Nachbarschaft einer CIN 1, aber auch unabhängig davon. Bei Patientinnen mit positivem HPV-Nachweis, ohne Vorliegen einer CIN bei Erstdiagnose, entwickelte sich in 65% eine CIN 2/3 innerhalb von zwei Jahren bei dreimonatigem Kontrollintervall (Koutsky et al., 1992).

	Remission (%)	Persistenz (%)	Progression (%)
CIN 1	55	30	15
CIN 2	40	30	20-30
CIN 3	10	20-40	50-70

Tabelle 4: Spontaner Verlauf (%) der Zervixdysplasie ohne Therapie (Hillemanns, 1997)

Wie man Tabelle 4 entnehmen kann, kommt eine Entstehung der schweren Dysplasie aus einer unbehandelten leichten Dysplasie der Portio uteri (CIN 1) in etwa 15-20% vor. In 5-10% kann sogar eine leichte Dysplasie in ein Karzinom der Zervix übergehen (Coppelson 1970; Kottmeier 1961; Richart und Barron 1969). Es zeigt sich eine mittlere Remissionsrate von ungefähr 55%.

Bei einer mäßigen Dysplasie (CIN 2) liegt eine Remission von 40% vor und bei 30% zeigt sich eine Progression zum invasiven Karzinom.

Die Entwicklung einer schweren Dysplasie bzw. einem Carcinoma in situ (CIN 3) in ein Zervixkarzinom kommt zeitabhängig bei 20-70% der Frauen vor. Die Rate der Progressionen nimmt abhängig von der Länge der Kontrollabstände zu und liegt bei einer Nachbeobachtung von über 10 Jahren bei bis zu 74% (Hillemanns et al., 1997).

1.2.4 CIN: Historie und Risikofaktoren

Rigoni–Stern war einer der Ersten, der sich bereits 1842 Gedanken über die Entstehung des Karzinom der Zervix uteri Gedanken machte.

Seine Studien bewiesen, daß Prostituierte im Vergleich zu Nonnen signifikant häufiger an Karzinomen der Geschlechtswege erkrankten.

Mittlerweile zählen Promiskuität und der frühe Beginn der sexuellen Aktivität im Adoleszentenalter zu den wichtigsten Risikofaktoren der Tumorentstehung (Schiffmann et al., 1995).

Die ersten Erkenntnisse eines Zusammenhangs zwischen einer HPV-Infektion und der Entstehung zervikaler Neoplasien gehen auf Vermutungen von Zur Hausen (1976) zurück. Dieser beruft sich wiederum auf Ergebnisse einer Studie von Syverton und Berry aus dem Jahr 1935, worin Papillomviren bei Kaninchen Karzinome der Haut verursachten. 40 Jahre später veröffentlichten Meisel et al., dass bestimmte Papillomviren dysplastische Veränderungen der Zervix uteri hervorrufen.

Durch die Weiterentwicklung molekularbiologischer Nachweismethoden in der Diagnostik konnten HPV-DNA Typen aus dysplastischem Gewebe und Karzinomzellen isoliert werden (Galloway und McDougall 1989).

Zur Zeit werden Infektionen mit bestimmten Humanen Papillomviren als wichtigste Risikofaktoren für die Entwicklung von Zervixkarzinomen und auch weiteren anogenitalen Karzinomen verantwortlich gemacht (Schiffmann et al., 1993).

Die Anfang der 80er Jahre entwickelten Nachweismethoden von virusspezifischen DNA-Sequenzen, ermöglichten es, Humane Papillomviren auf genetischer Ebene näher zu identifizieren und genotypisch genauere Unterteilungen nach „Typen“ vorzunehmen. 1982 konnte DNA des Typs 16 (Dürst et al., 1987) und wenig später des HPV-Typs 18 (Boshart et al., 1984) aus Zervixkarzinomgewebe isoliert werden. Weiterhin ließ sich feststellen, daß bei fast 95% aller Zervixkarzinome und bei 90% aller Carzinoma in situ und Dysplasien HPV-DNA nachgewiesen werden konnte (Wagner 1989).

Die Karzinogenese wird durch verschiedene externe Faktoren beeinflusst. Als wohl einer der wichtigsten Kofaktoren stellt das Rauchen einen signifikanten Risikofaktor dar (Vonka et al., 1984).

Irvin et al. (1988) kategorisierten die orale Kontrazeption nicht als eigenständigen Risikofaktor, jedoch stellen sie eine hohe Assoziation mit der Veränderung im Sexualverhalten der Jugendlichen und resultierend einem gesteigerten HPV-Infektionsrisiko.

Auch die Ernährung spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Karzinomen. Vitaminmangel, speziell von Vitamin A und C, erhöhen das Erkrankungsrisiko (Graham 1984). Die Retinoide spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Differenzierung und Proliferation des epithelialen Gewebe. Besonders reichhaltige alimentäre Versorgung mit Vitamin A führt zur signifikanten Abnahme der Entstehung des Zervixkarzinoms (Romney et al., 1981).

Immunsupprimierende Erkrankungen wie HIV-Infektion oder Organtransplantation zeigen ein erhöhtes Risiko für die Tumorentstehung (Wright und Sun 1997). Hillemanns bestätigte diese Annahme. Darüber hinaus zeigte er bei 102 HIV-positiven und 96 HIV-negativen Patientinnen, daß eine niedrige CD4-Lymphozyten-Zahl ($< 200 / \mu\text{l}$) zusätzlich das Risiko der Tumorentstehung erhöht und häufig mit Dysplasien anderer anogenitaler Lokalisationen assoziiert ist (Hillemanns et al., 1996).

Herpes-simplex vom Typ 2 ist ebenfalls eine sexuell übertragbare Erkrankung, die jedoch keine eigenständige karzinogene Wirkung zeigt, sondern nur als mutagener Kofaktor eine Rolle spielen kann (Rawls et al., 1968).

Andere sexuell übertragbare Erreger wie Chlamydien, Gonokokken, Treponemen und Trichomonaden stellen nach bisherigen Erkenntnissen keinen signifikanten Risikofaktor für die Krebsentstehung dar (Rotkin 1973).

Weiterhin muß unterschieden werden zwischen Kofaktoren, die die Aquirierung einer HPV-Infektion sowie Virusreplikation begünstigen und unabhängigen Risikofaktoren. Genetische Faktoren, die es dem Immunsystem nicht erlauben, eine HPV-Infektion effizient zu eliminieren, wie z.B. HLA-Konstellation und -Expression oder ein kürzlich identifizierter Nukleotid-Polymorphismus im Bereich des Fas Promotors, stellen möglicherweise wichtige Faktoren dar (Brady et al., 2000; Lai et al., 2003). Auch ein Nukleotid-Polymorphismus von p53 (codon 72) bewirkt eine unterschiedliche Stabilität des Proteins in Gegenwart des viralen Onkoproteins E6 und könnte dadurch die transformierenden Eigenschaften von HPV beeinflussen (Storey et al., 1998; Zehbe et al., 2001). Entscheidend für die maligne Progression ist eine kontinuierliche, starke Expression der viralen Onkogene E6 und E7. Diese bewirken eine genetische Instabilität der Zelle, die mit einer veränderten Expression und veränderten funktionellen Eigenschaften einer noch unbekanntem Zahl von zellulären Genen einhergeht (Nees et al., 1998; Poignee et al., 2001; Solinas-Toldo et al., 1997).

1.2.5 Diagnostik und Screening

In der Diagnostik der HPV-Infektion stehen direkte und indirekte Methoden zur Wahl. Der indirekte Nachweis durch Zytologie, Kolposkopie und Histologie weist die unterschiedlichen Stadien des Zervixkarzinoms durch Betrachtung der Epithelzellen der Cervixschleimhaut nach. Liegt eine Dysplasie vor, ist eine Beteiligung des Papillomvirus sehr wahrscheinlich.

Die etablierten Methoden zum direkten Nachweis und zur Typisierung von HPV im Gewebe und in Abstrichen sind DNA-Nachweise mittels Hybridisierung oder Nukleinsäureamplifikationstechniken.

Der in dieser Studie durchgeführte Nachweis einer HPV-Infektion ist ein serologischer Test und weist Virushüllenproteine mittels Antigen-Antikörper-Reaktion nach.

1.2.5.1 Historie

Schon im Jahr 1925 legte der Hamburger Frauenarzt Hans Hinsemann (1881-1959) mit der Entwicklung der Kolposkopie die Grundsteine der heutigen Krebsfrühdagnostik.

Die bis heute als Standard durchgeführte Screeningmethode der Exfoliativzytologie geht auf den Gynäkologen Georg N. Papanicolaou zurück, welcher 1943 zusammen mit Herbert Frederick Traut im „American Journal of Obstetrics and Gynecology“ über den diagnostischen Wert der Abstrichzytologie bei Zervixkarzinomen schrieb. Unter dem Titel „Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear“ beschrieben sie ihren zufälligen Befund, dass der Abstrich aus der Vagina auffällige Zellen bei Frauen aufweist, die ein Zervixkarzinom trugen.

Diese Methode der Erkennung präkanzeröser Vorstufen zur Krebsfrüherkennung ist seit 1971 in der Bundesrepublik Deutschland als gesetzlich vorgeschriebene Krebsvorsorgeuntersuchung eingeführt worden. Alle Frauen ab dem 20. Lebensjahr sollten jährlich eine Untersuchung durchführen lassen, welche von den Krankenkassen übernommen wird. Innerhalb von 20 Jahren führte diese Krebsvorsorge zu einem Rückgang um 40% der Inzidenz und Mortalität des Zervixkarzinoms (Soost und Baur 1990).

Nach Empfehlung des Berufsverbandes der Frauenärzte (1982) ist eine Altersbegrenzung für diese Untersuchung aufzuheben. Bei jeder Frau ab dem geschlechtsreifen Alter ist eine Krebsvorsorgeuntersuchung angezeigt (Hillemanns et al., 1998).

In den letzten Jahren wird immer mehr über die Aufnahme eines Nachweises für den HP-Virus in die Routinediagnostik diskutiert.

1.2.5.2 Zytologie

Bei der Untersuchung von zytologischen Abstrichen von Portio und Zervix geht man davon aus, dass bei der Regeneration des Epithels die oberflächlichen Zellen abgestoßen werden und von einem Watteträger durch einen Abstrich gewonnen werden können. Dabei gewinnt man nicht nur die normalen Zellen (Plattenepithel), sondern beim Vorliegen einer Dysplasie auch die atypisch veränderten Zellen, sowie die einem Carzinoma in situ und einem invasivem Karzinom entsprechend veränderte Zellen. Die Exfoliativzytologie der Zervix uteri wird im deutschsprachigen Raum nach der Münchener Nomenklatur II (mod. 1997) klassifiziert (siehe Tab. 3).

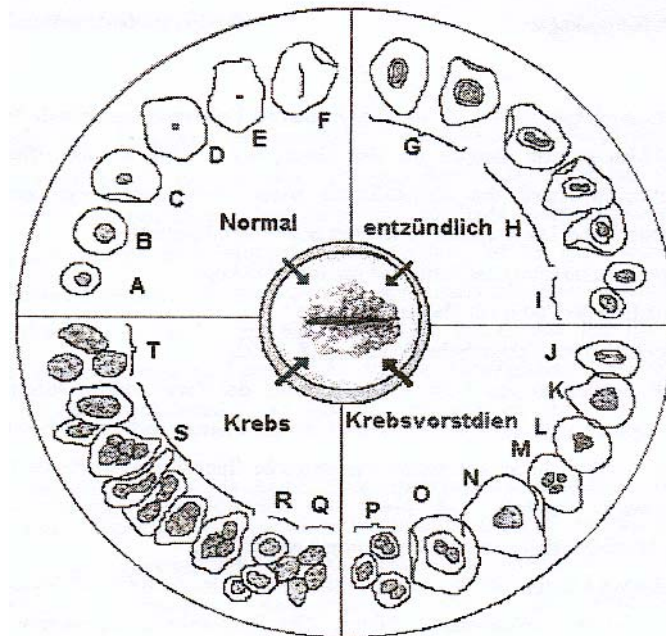


Abbildung 7: Schematische Darstellung von Zelltypen in zytologischen Abstrichen.

- A) Basalzelle B) Parabasalzelle C) Intermediärzelle D) beginnende Verhornung
 E) Verhornung F) Hornscholle G) Oberflächenzellen mit Entzündungszeichen
 H) Intermediärzellen mit Entzündungszeichen I) Basalzellen mit Entzündungszeichen
 J) Zellen mit hantelförmigem Kern K) Zellen mit unreifem Kern L) Zellen mit ausgelapptem Kern
 M) mehrkernige Zellen N) Zellgigantismus O) Zelle mit perinukleärem Hof (halo) P) abnorme Zelle der Basalschicht
 Q) präinvasive atypische Zellen R) Krebszellen vom Basaltyp S) differenzierte Zellen T) undifferenzierte Zellen
 (nach Pfeleiderer und Kaiser 1989)

Speziell durch Papillomviren befallene Zellen weisen typische Veränderungen auf. Es sind die Zellen des Plattenepithels und des metaplastischen Epithels, die infiziert werden und eine Veränderung im Kern und Zytoplasma aufweisen. Die Kolozyten zeigen gering vergrößerte Kerne mit erhöhtem Chromatingehalt. Die pyknotischen Kerne sind umgeben von einem grossen Aufhellungsherd (perinukleäre Halo- bzw. Kolozyten) und sind häufig zwei- bis vielkernig. Die Dyskeratozyten zeigen sich als kleine Zellen mit orangefarbenem Zytoplasma und pyknotischen Kern, die auch

zweikernig vorkommen können. Oft werden sie in dreidimensionalen Zellverbänden vorgefunden (Schneider et al., 1987).

Die zytologische Diagnostik zeigt für das Zervixkarzinom und seine Vorstadien eine sehr hohe Spezifität, aber eine relativ geringe Sensitivität. Daraus ergeben sich viele falsch-negative Ergebnisse, die bei der Planung und Durchführung von Krebsvorsorgeuntersuchungen in Betracht gezogen werden müssen (Soost et al., 1991). In dieser Studie erzielt die Zytologie als Screeningmethode eine Sensitivität von nur 80 %, jedoch eine hohe Spezifität von 99,95% für Pap III bis Pap IV. Der positive prädiktive Wert für Pap IIID liegt bei 73,4% und für Pap IVa bis V zwischen 90,6 - 95,5%. Ob eine Frau wirklich gesund ist, zeigt sich bei dem negativen prädiktiven Wert von 98,1%. Allerdings wurden die Ergebnisse retrospektiv und ohne Validierung durch den HPV - Nachweis erzielt. Der größte Nachteil des zytologischen Screenings ist die unbefriedigende Sensitivität.

Neueste Feldstudien aus Deutschland zeigten beim primären Screening Sensitivitäten von nur 20-32% zum Nachweis von CIN 2/3 und invasivem Zervixkarzinom (Schneider et al., 2000; Iftner et al., 2000).

Die Genauigkeit des zytologischen Pap -Tests ist limitiert durch die falsch - negative Abstrichrate von 3 - 30 % bzw. bei leichten Dysplasien von bis zu 55 %. Diese hohen Werte spiegeln unter anderem menschliches Versagen wider, z.B. durch mangelhafte Probengewinnung und Abstrich-Herstellung, das Übersehen von atypischen Zellen durch den Zytologen, Diagnosefehler durch den Arzt, Interpretationsfehler und nicht einheitliche Dysplasie - Klassifikationen. Entscheidend für einen repräsentativen Abstrich ist die Gewinnung von endozervikalen Drüsenzellen, da die meisten Plattenepithelkarzinome an der Transformationzone entstehen. Bei histologisch gesichertem Zervixkarzinom zeigen ungefähr 75% der zytologischen Befunde einen falsch-negativen zytologischen Zervixabstrich, welcher auf nicht repräsentative zytologische Abstriche zurückzuführen ist. Bei ungefähr 25% der falsch-negativen Abstriche werden atypische Zellen im zytologischen Präparat übersehen (Anderson et al., 1992).

Die Korrelation zwischen der Intensität des zytologischen Screenings und der Mortalität des Zervixkarzinoms zeigt deutlich: je intensiver das Screening in einer

Population ist, desto geringer ist die Inzidenz des Zervixkarzinoms. Leider nehmen nur weniger als 50% der Frauen regelmäßig an einer Krebsvorsorge teil und, wie empfohlen, jährlich nur ungefähr 30%.

Obwohl eine signifikante Abnahme der Zervixkarzinommortalität zu verzeichnen ist, nimmt die Inzidenz der Präkanzerosen an der Zervix uteri deutlich zu, insbesondere bei jüngeren Patientinnen im reproduktiven Alter (Paterok et al., 1995). Um die falsch-negative Rate zu senken, sind im Laufe der Jahre neue Technologien entwickelt worden (Spitzer 1998).

Derzeit besitzen zwei flüssigkeitsgestützte oder dünnsschichtzytologische Verfahren eine FDA-Zulassung (US-amerikanische Arzneimittelbehörde): ThinPrep™ (Fa. Cytoc) und SurePath™ (Fa. Tripath). Die Dünnschichtzytologie scheint im Screening eine bessere Sensitivität bei vergleichbarer Spezifität und erniedrigter Rate an unklaren Befunden aufzuweisen. So ergab sich in einer Metaanalyse von 24 Studien mit ThinPrep versus konventioneller Zytologie eine höhere Sensitivität für LSIL und HSIL (IIID – IVa) (Abulafia et al., 2003).

Ein Vorteil liegt auch in der Möglichkeit, an der konservierten Flüssigkeit simultan oder erst nach Vorliegen eines auffälligen zytologischen Befundes (Reflex-HPV-Test) einen HPV-Test durchführen zu können. Die Dünnschichtzytologie ist mit erhöhten Kosten verbunden. Aufgrund besserer Ergebnisse stellten das englische/schottische und das dänische Gesundheitssystem ihre Screeningzytologie auf die ThinPrep-Dünnschichtzytologie um.

1.2.5.3 Kolposkopie

Die 1925 von Hinselmann begründete Untersuchungsmethode beruht auf der direkten Betrachtung von Vagina- sowie Portiooberfläche und dem einsehbaren Anteil des Zervikalkanals, per Spekulum unter 10-40 facher Vergrößerung, mit einer speziellen Lupe. Es werden bestimmte Merkmale, wie die Struktur der Epithelzellen, Gefäßarchitektur, Farbe sowie die Oberfläche der Portio uteri beurteilt.

Durch Applikation von 3-5% Essigsäure wird der Zervixschleim aufgelöst; das Zervixepithel quillt auf und die Grenze zwischen Platten- und Zylinderepithel wird

besser sichtbar. Zusätzlich nimmt das atypische Epithel eine weißliche Farbe an, und Areale mit übermäßiger Epithelproliferation (Matrixbezirke) können besser beurteilt werden (Dudenhausen und Schneider 1994).

Additiv kann eine „Schiller`sche Jodprobe“ aufgetragen werden. Diese beruht auf der Reaktion des Jods mit Glykogen, welches von normalen Plattenepithelzellen der Zervix gebildet wird. Dysplastische und maligne entartete Epithelzellen verlieren die Fähigkeit zur Glykogenbildung und verfärben sich daher nicht, sie sind jodnegativ.

Kolposkopischer Befund	Graduierung	CIN
Normale kolposkopische Befunde:	Grad 0	
Originäres Plattenepithel		
Ektopie (Zylinderepithel)		
Normale Transformation		
Abnorme kolposkopische Befunde:		
Geringe Veränderungen	Grad 1	HPV / CIN0 oder CIN 1
Abnorme Transformation		
Feines Mosaik		
Feine Punktierung		
Feine Leukoplakie		
Erosionen		
Ausgeprägte Veränderungen	Grad 2	CIN 2-3
Abnorme Transformation		
Grobes Mosaik		
Ausgeprägte Leukoplakie		
Irreguläre Gefäßzeichnung		
Ulkus		
Invasives Karzinom		
Verschiedene kolposkopische Befunde		
Kondylom, Polyp, Entzündung, u.a.		

Ungenügende kolposkopische Beurteilung

Plattenepithel-Zylinderepithel-Grenze nicht sichtbar

Schwere Entzündung oder Atrophie

Portio nicht einstellbar

Tabelle 5: Kolposkopie-Nomenklatur (europäische Terminologie, 1989)

Die Indikation zur Kolposkopie ist gegeben nach dem ersten auffälligen zytologischen Abstrich (Pap IID oder mehr), zur Verlaufskontrolle bei CIN und zur präoperativen Therapieplanung bei CIN oder Verdacht auf ein invasives Zervixkarzinom (Hillemanns et al., 1997).

Die Früherkennung von CIN ist bisher durch den simultanen Einsatz von Kolposkopie und Zytologie in optimaler Weise erreicht. Die Sensitivität der Kolposkopie ist der Zytologie mit etwa 80-85% leicht überlegen. Die Kombination beider Methoden erreicht eine Sensitivität von 97-99% (Limburgh 1958; Naveratil 1955). Allerdings ist die Kolposkopie als alleinige Screeninguntersuchung aufgrund hoher falsch-positiver Befunde (10-30%) nicht geeignet.

Die Kolposkopie in Kombination mit der Knipsbiopsie stellt die Standarddiagnostik in der Differentialdiagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie dar. Sie ist die sensitivste Methode, um subklinische HPV-Infektionen der Zervix zu diagnostizieren und zeigt eine wesentliche Bedeutung für die genaue Lokalisation und Beschreibung der Ausdehnung der Läsionen nach Essigsäureapplikation. Jedoch ist eine essigweiße Reaktion nicht spezifisch, denn zu 80 % sind essigweiße Areale nicht mit neoplastischen Veränderungen und Zervixkarzinomen assoziiert (Coppelson et al., 1993).

Die kolposkopische Untersuchung ist schwierig und erfordert viel Erfahrung in der Diagnostik, daher ist bei verdächtigen Arealen eine histologische Abklärung mittels Knipsbiopsie einzuleiten (Reit und Scalzi 1985).

Die endgültige Diagnose der zervikalen intraepithelialen Neoplasie, des mikroinvasiven Karzinoms oder des invasiven Karzinoms ist wegen daraus

resultierender therapeutischer Konsequenz nur auf Basis einer histologischen Untersuchung erlaubt. Eine histologische Untersuchung ist bei jeder auffälligen Kolposkopie erforderlich, sowie bei zytologischen Befunden, welche mindestens eine Pap III aufweisen (Pfleiderer und Kaiser 1989).

1.2.5.4 Schwächen der derzeitigen Krebsvorsorge

Der Erfolg und die Kosteneffizienz der Zytologie bei der Früherkennung des Zervixkarzinoms ist zwar unbestritten, dennoch wird die Methode wegen verschiedener Mängel kritisiert, Uneinigkeit herrscht auch über die optimale Organisation der Screeninguntersuchung selbst. Die empfohlenen Intervalle zwischen den Routineabstrichen schwanken von einem Jahr (USA, Deutschland) bis zu fünf Jahren (Finnland). In den skandinavischen Ländern, England und den Niederlanden ist das Programm zentral organisiert, in der Mehrzahl der verbleibenden Industrienationen ist es dagegen opportunistisch, d.h. die Teilnahme erfolgt nicht aufgrund einer organisierten Einladung sondern aus Antrieb der Frauen selbst. Legt man die erreichte Absenkung der Inzidenz des Zervixkarzinoms zugrunde, sind zentral gelenkte Vorsorgeprogramme unabhängig vom Intervall der Untersuchungen erfolgreicher. So weist Finnland neben Spanien die niedrigste Rate an Neuerkrankungen aller europäischen Staaten auf. Unabhängig vom jeweiligen Konzept ist es jedoch nirgends gelungen, das Zervixkarzinom selbst in Populationen mit optimaler Vorsorge völlig zu eliminieren. In England hatten mehr als 60% aller vor dem 45. Lebensjahr am Zervixkarzinom verstorbenen Patientinnen vor der Diagnosestellung regelmäßig am Früherkennungsprogramm teilgenommen (Macgregor et al., 1994). Auch wird die Inzidenz des Adenokarzinoms der Zervix durch die auf der Zytologie basierende Vorsorge offensichtlich überhaupt nicht beeinflusst (Chao et al., 1996).

Im Vergleich zum HIV-Antikörper Nachweis bei der Blutspenderuntersuchung mangelt es der Zytologie an mehreren für einen Screeningtest wichtigen Qualitäten. So ist die Methode personalintensiv, denn jeder Abstrich muss gründlich für mehrere Minuten lichtmikroskopisch durchgemustert werden. Somit ist die Qualität der

Befundung von der Qualifikation und der Verfassung des Gutachters abhängig. Dies wiederum erklärt die, verglichen mit dem automatisierten und standardisierten HIV-Antikörpernachweis, schlechtere Reproduzierbarkeit der Resultate. Auch die für die Beurteilung der Qualität eines Screeningtests entscheidenden Sensitivitäts- und Spezifitätsraten fallen für die Zytologie deutlich schlechter aus, als für den HIV-Antikörpernachweis. Definiert man die gesuchte Zielkrankheit als mäßiggradige/schwere Dysplasie sowie Carzinoma in situ, dann liegen die veröffentlichten Zahlen zur Sensitivität der Zytologie zwischen 22% und 84%, die Spezifität bei 77% und 99% (Meijer et al., 1992; Ratnam et al., 2000; Schneider et al., 2000; Iftner et al., 2000). Die Studien unterscheiden sich in einem wesentlichen Punkt im Design. Während Schneider, Ratnam und Iftner eine Evaluierung der tatsächlich im Massenscreening erhobenen zytologischen Befunde durchführten und die Sensitivität der Zytologie in diesen Studien lediglich bei 22% bis 44% lag, wurde in den anderen Untersuchungen eine Expertenzytologie zugrunde gelegt, die der realen Screeningsituation nicht entspricht, da im Vorsorgealltag nicht jedes Präparat von mehreren Zytologen untersucht werden kann.

Allgemein wird davon ausgegangen, dass bei korrekter Durchführung jede hochgradige zervikale Neoplasie durch den zytologischen Abstrich erkannt werden kann und somit andernfalls ein ärztlicher Fehler vorliegen muss. Gern wird in diesem Zusammenhang die Formel $2/3$ Abnahmefehler und $1/3$ Interpretationsfehler angegeben (Glösser 1996). Diese Vorstellungen entbehren jedoch einer wissenschaftlichen Grundlage. In mehreren retrospektiven Untersuchungen lag der Interpretationsfehler zwischen 3 und 50% (Macgregor et al., 1994; Koss 1993; Gay et al., 1985). Macgregor et al. untersuchten 1994 in einer definierten Screeningpopulation die Gründe für das Auftreten von 280 invasiven Zervixkarzinomen bei mehr als 300.000 Frauen in Schottland. Hier ergab sich ein Interpretationsfehler von 22% bei zytologischen Präparaten von am Vorsorgeprogramm teilnehmenden Frauen, die dennoch am invasiven Karzinom erkrankten. In dieser wie in anderen Studien wurde die Mehrzahl der Präparate als korrekt abgenommen eingestuft. Sie enthielten ausreichend Endozervikal- und Plattenepithelzellen, waren korrekt ausgestrichen und gefärbt. Die Häufigkeit eines

gesicherten Abnahmefehlers lag bei 12 – 20% (van der Graaf et al., 1987; Walboomers et al., 1995). Keine größere Studie konnte alle Versager der Methode Zytologie überwiegend oder gar ausschließlich dem Abnahme- und/oder Interpretationsfehler zuordnen.

Es muss somit auch für die Zytologie ein methodenimmanenter Fehler angenommen werden, wie er für nahezu alle anderen diagnostischen Verfahren selbstverständlich akzeptiert wird, etwa das eingangs dargestellte serologische Fenster beim HIV-Antikörper-Nachweis. Der korrekt abgenommene Abstrich erfasst z.B. tief endozervikal von Reservezellen ausgehende Läsionen meist nicht. Neoplastische Zellen können weiterhin eine gegenüber korrekt differenzierten Plattenepithelzellen verstärkte Zelladhäsion untereinander aufweisen und dadurch trotz korrekter Technik vom Abstrich nicht erfasst werden. Unabhängig davon, wie sich zytologische Screeningversager nun genau erklären, scheint der HPV-Test gegenüber diesen Fehlermöglichkeiten unempfindlich. In archivierten Zytologiepräparaten, die als unauffällig klassifiziert wurden, obwohl sich im weiteren Verlauf bei der betroffenen Frau ein Zervixkarzinom entwickelte, konnte HPV-DNA nachgewiesen werden, selbst in Abstrichen, die mehr als sieben Jahre vor der Erstdiagnose entnommen wurden (Wallboomers et al., 1995; Wallin et al., 1999) .

1.2.6 Direkte Virus-Nachweise

Für die HPV-Diagnostik stehen derzeit drei etablierte Testverfahren zur Verfügung. Das derzeit einzige von der FDA (US-amerikanische Arzneimittelbehörde) zugelassene Verfahren stellt der Hybrid-Capture-Assay (HCII, Digene Diagnostic, USA) dar, der auf einem nicht-radioaktiven Enzym-Immuntest beruht und RNA-Sonden zum Nachweis von HPV-DNA nutzt. Die zwei anderen Nachweisverfahren erfolgen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Hillemanns und Dannecker 2002).

1.2.6.1 Hybrid-Capture-Assay (HCII)

Die Methode dieses Tests beruht auf der Hybridisierung einer DNA-RNA-Sonde und zwei Antikörperreaktionen. Es handelt sich um ein signalverstärkendes Hybridisierungsverfahren zum semiquantitativen Nachweis von 18 verschiedenen HPV-Typen. Eine Identifikation des exakten HPV-Typs ist jedoch nicht möglich, der Test kann nur zwischen zwei HPV-Gruppen unterscheiden. Eine Gruppe weist ein niedriges kanzerogenes Potential auf und die andere ein mittleres bis hohes Potenzial.

Bei diesem kommerziellen Test handelt es sich um die zweite Generation von Hybrid Capture, die im Vergleich zur ersten Generation wesentlich sensitiver im Nachweis von HPV-DNA ist und mehr HPV-Typen mit hohem kanzerogenem Potential nachweisen kann. HCII ist standardisiert, leicht und signifikant schneller durchführbar als andere Verfahren.

Er zeigt eine gute Reproduzierbarkeit von 84 % bis 94 % und eine gute bis exzellente Übereinstimmung (Schiffman et al., 1995).

1.2.6.2 Polymerase-chain-reaction (PCR)

Bei dieser Methode werden mit Hilfe zweier DNA-Sonden und einem hitzestabilen Enzym (Tag-Polymerase) die gewünschten DNA-Sequenzen amplifiziert und sichtbar gemacht.

Die Gesamtreaktion durchläuft ca. 30 Zyklen, wobei ein exponentieller Anstieg der Konzentration an viraler DNA (theoretisch über 1.000.000 DNA-Kopien) erreicht wird. Nach elektrophoretischer Auftrennung der viralen DNA erfolgt zum HPV-Nachweis die Southern-blot-Hybridisierung. Durch diese Vervielfältigung kann extrem wenig HPV-DNA pro Zelle detektiert werden. Bei der Southern-blot-Hybridisierung werden, mittels bakteriellen Restriktionsenzymen, die aus dem Gewebe extrahierten Nukleinsäuren in spezifische Fragmente geteilt, und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Darauf folgen die Denaturierungsschritte und eine Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden.

Die PCR ist wegen des apparativen Aufwands relativ teuer. Mit der PCR lässt sich in entsprechend spezialisierten Laboratorien eine Sensitivität erreichen, die den HCII übertrifft. Allerdings ist die Methode sehr empfindlich und die Befundsabweichungen zwischen verschiedenen Laboratorien sind teils erheblich (Neumann und Kohlhoff, 2001).

Diese Methode wird gewöhnlich in der Forschung zum hochsensitiven Nachweis von minimaler Ziel-DNA in klinischen Proben eingesetzt. Durch die übermäßig hohe Sensitivität besteht die Gefahr falschpositiver Ergebnisse, die oft durch eine hohe Kontaminationsrate minimaler viraler DNA begründet ist (Gross et al., 1992). Studien belegen Spitzenwerte von 90-100 % HPV-DNA bei high-grade SIL oder bei Zervixkarzinom mittels der PCR-Methode (Bosch et al., 1995).

Test	Sensitivität	Spezifität	Durchführbarkeit	Kommentar
PCR	sehr hoch	hoch	gut	sehr sensitiv, hohe falschpositive Rate, hoher Kosten/Zeitaufwand
Hybrid-Capture	hoch	hoch	gut	sehr gut für die Routinediagnostik

Tabelle 6: Übersicht über die Hybridisierungsverfahren

(Zusammenfassung in Anlehnung an Johnsen et al., 1995 und Reid et al., 1995)

1.2.6.3 HPV-Screening

Die HPV-Diagnostik kann im Rahmen der Krebsfrüherkennung als primäre Screeningmethode allein oder in Kombination mit dem zytologischen Abstrich, sekundär als Triage-Methode zur Abklärung von unklaren bzw. geringgradigen zytologischen Veränderungen (Reflex-HPV-Test) oder anstatt der zytologischen Verlaufskontrolle, sowie im Zustand nach erfolgter Therapie von CIN oder

Zervixkarzinom durchgeführt werden. Der Einsatz des HPV-Tests im primären Screening wurde mittlerweile in mehreren internationalen Studien untersucht. Hierbei ergab sich eine Sensitivität für den Nachweis von hochgradigen Dysplasien bzw. invasivem Zervixkarzinom von 89 bis 95 % (Cuzick et al., 1999; Iftner et al., 2000; Schneider et al., 2000; Clavel et al., 2001). Die Sensitivität der „Expertenzytologie“ lag zwischen 75% und 84%, während die Ergebnisse des zytologischen Screenings in den beiden deutschen sowie einer kanadischen Feldstudie deutlich schlechtere Ergebnisse mit 20 bis 40% ergaben. Hierbei wurde der zytologische Abstrich in den Vertragslabors der jeweiligen gynäkologischen Praxen beurteilt (Ratnam et al., 2000; Schneider et al., 2000; Petry et al., 2003). In all den o.g. Screeningstudien lag der negative Vorhersagewert eines HPV-negativen Befundes höher als für die zytologische Untersuchung. Das Erkrankungsrisiko nach einem negativen HPV-Test ist daher sehr gering, so dass z.B. die Untersuchungsintervalle gestreckt, und damit die Kosteneffektivität der Vorsorge gesteigert werden könnte. Allerdings ist die „falsch positive“ Rate des Hochrisiko-HPV-Tests etwas höher im Vergleich zum einmaligen zytologischen Abstrich. Studien haben gezeigt, dass Frauen mit einem positiven HPV-Nachweis und zytologisch negativem Ergebnis ein erhöhtes Risiko haben, später eine CIN zu entwickeln (Clavel et al., 2000; Josefsson et al., 2000).

Da die Prävention des Gebärmutterhalskrebses durch ein zytologisches Screening allein nur schwer erreichbar zu sein scheint, wurden Studien unter Verwendung von HPV-DNA als additives Screeningverfahren durchgeführt. Die Prävalenz einer CIN 2/3 bei Vorliegen einer HPV-Infektion steigt deutlich mit dem Alter an, so dass jenseits von 30 Jahren ein additives Screeningprotokoll mit Zytologie und HPV-Bestimmung ein sensibles und kosteneffektives Verfahren darstellen könnte, da das Kontrollintervall verlängert und nach holländischen Daten die kolposkopischen Untersuchungen reduziert werden können (Nobbenhuis et al., 1999; Cuzick et al., 2003). In der Altersgruppe bis 30 Jahren ist aufgrund der hohen Prävalenz der HPV-Infektion die diagnostische Wertigkeit eines alleinigen HPV-Screenings nicht sinnvoll.

1.2.6.4 Serologie

Als serologisches Nachweisverfahren befindet sich der „Viroactiv“-Test der Firma Virofem Diagnostica GmbH neu auf dem Markt.

Grundlage des Testsystems bilden monoklonale Antikörper, die gegen typenspezifische Bereiche des Kapsidproteins L1 gerichtet sind (Sapp et al., 1994). Dieses Protein wird ausschließlich im Verlauf einer aktiven und somit klinisch relevanten Infektion gebildet und dient der Verpackung der viralen Erbsubstanz. Die Antikörper erkennen die unterschiedlichen Strukturen der Hüllproteine und binden an die für sie passenden Stellen. Ein weiterer Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, bindet sich an den ersten. Durch eine enzymatische Reaktion, in der ein Substrat zu einem farbigen Produkt umgesetzt wird, lässt sich eine allgemeine Aussage auf das Vorhandensein des Virus ermöglichen. Durch Auswahl des Antikörpers im Nachweisverfahren erfolgt eine genaue Bestimmung der Viren bis hin zum einzelnen Typ (Neumann und Kohlhoff 2001). Es wird zwischen einem Screening- und einem High-Risk-Test unterschieden. Der Screening-Test erkennt alle bis heute bekannten Papillomviren und eignet sich daher für den Nachweis der produktiven Phase einer HPV-Infektion. Der High-Risk-Nachweis erkennt selektiv die sogenannten Hochrisiko-Typen (High Risk) HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58 (Griesser et al., 2000; Sapp et al., 1994), wiederum in der produktiven Phase der Infektion.

Im Gegensatz zu den DNA-Nachweisen, bei denen zwischen latenten und aktiven, klinisch relevanten Infektionen nicht unterschieden werden kann, besteht der Vorteil im ausschließlichen Nachweis von aktiven Stadien der Virusvermehrung.

Und auch im Vergleich zur routinemäßig durchgeführten, zytologischen Untersuchung, die je nach Untersucher und Präparat 30-50% schwergradiger Krebsvorstufen nicht erkennt, detektieren die monoklonalen Antikörper zuverlässig Papillomvirusproteine.

Dieses Verfahren stellt eine kostengünstige Alternative zu den oben beschriebenen DNA-Nachweisen dar, weil Geräte und Materialien zur Testdurchführung deutlich günstiger sind.

Als Probenmaterial können Zervix-Portio-Abstriche, flüssigkeitsgeschützte Zellpräparate, sowie Gewebeproben verwendet werden. Auch bereits ältere, nativ und nach Papanicolaou gefärbte Präparate sind verwendbar.

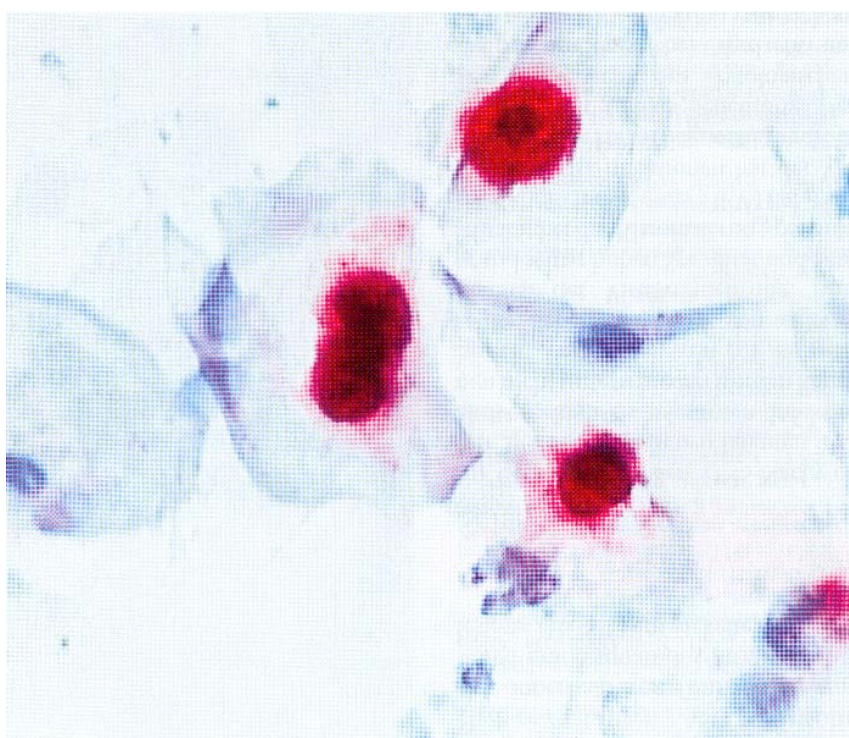
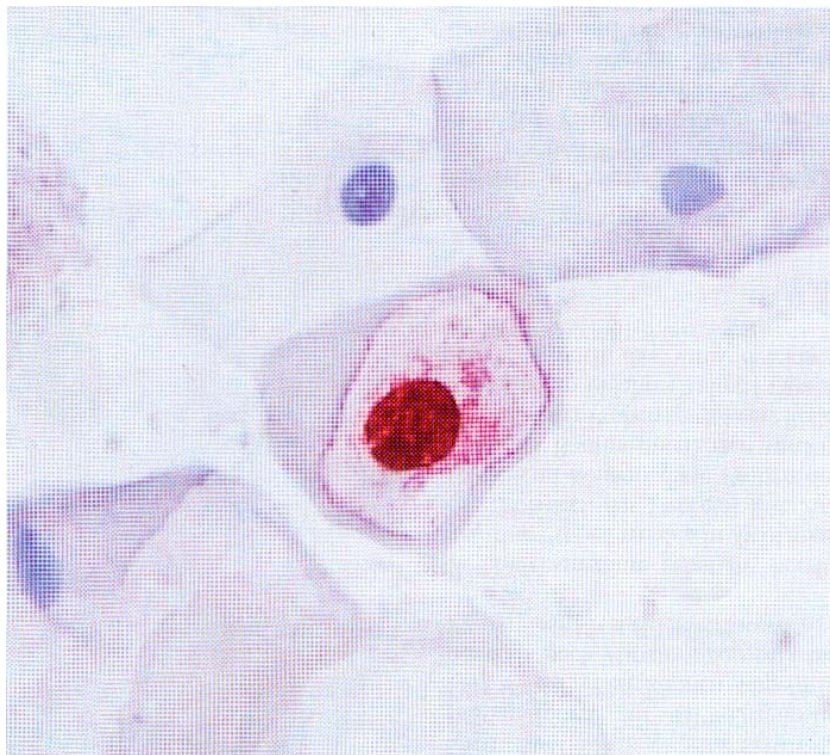


Abbildung 8 und 9: Immunzytologischer Nachweis von HPV in 400facher Vergrößerung - Positiv angefärbte Zellkerne mit Viroactiv Antigennachweis

1.2.7 Neueste Biomarker in der Differentialdiagnostik von HPV- assoziierten Läsionen

Verschiedene zelluläre Proteine sind als potenzielle Biomarker für das Zervixkarzinom evaluiert worden. In vielen Fällen konnte ein wirklicher diagnostischer Nutzen der jeweiligen Biomarker nicht nachgewiesen werden. Ein neuer vielversprechender Ansatz scheint der immunchemische Nachweis von p16INK4a zu sein, da die starke Überexpression dieses Proteins als direkte Folge der transformierenden Aktivität des E7 Onkoproteins von HR-HPV Typen in dysplastischen Zellen des Zervixepithels eng mit dem pathogenetischen Mechanismus der zervikalen Krebsentstehung assoziiert ist. Auf der Basis des immunchemischen Nachweises von p16INK4a-Überexpression lassen sich daher robuste, spezifische und sensitive diagnostische Verfahren entwickeln, die wesentlich zur Steigerung der Qualität und Kosteneffizienz der gegenwärtigen Screeningverfahren beitragen können (Klaes et al., 2001/2002).

Der Nachweis von integrierten Papillomvirussequenzen stellt möglicherweise einen interessanten Biomarker dar, der es erlaubt, das Progressionsrisiko von Läsionen des Zervixepithels besser abzuschätzen. Ferner können durch den Nachweis von Zellklonen mit integrierten viralen Genomkopien auch Rezidive nach operativer Entfernung der primären Läsion viel früher erkannt werden (Klaes et al., 1999).

1.3 Ziel der Studie

Die Krebsdiagnostik dient der möglichst frühen Erkennung und Therapie von neoplastischen Erkrankungen durch Vorsorgeuntersuchungen. Nach §§ 25, 26 SGB haben Versicherte Anspruch auf Maßnahmen zur Früherkennung von Krankheiten. Krebs ist nach Gefäßerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland

und scheint aus demographischen Gründen bald die häufigste Todesursache in den Industrieländern zu sein.

Durch die Einführung der zytologischen Krebsfrüherkennungsuntersuchung 1971 kam es zu einem deutlichen Rückgang in der Inzidenz des Zervixkarzinoms. Allerdings stagniert diese positive Entwicklung seit Mitte der 80-er Jahre. Zum einen beruht dies auf der nur mäßigen Inanspruchnahme der Krebsvorsorgeuntersuchungen bei Frauen von 30-50%. Insbesondere sinkt mit zunehmendem Alter die Teilnahme, obwohl die Häufigkeit des Zervixkarzinoms im Alter zunimmt. Zum anderen jedoch zeigt der zytologische Abstrich seine Limitationen mit einer nur mäßigen Sensitivität von ca. 50% im Nachweis von hochgradigen Zervixdysplasien und Zervixkarzinomen. Derzeitige Studien weisen auf eine deutlich höhere Sensitivität durch die Verwendung des HPV-DNA-Testes hin, welche zwischen 90 und 95% liegt. Da der HPV-DNA-Test eine schlechte Spezifität aufweist, ist seine Einführung allerdings umstritten.

Ziel dieser Studie ist die Evaluierung eines neuen HPV-Nachweises, der nicht die HPV-DNA, sondern ein HPV-Proteinimmun zytochemisch nachweist, um die Sensitivität der zytologischen Untersuchung zu verbessern. Außerdem soll dieser HPV-Test auf seine Sensitivität sowie auch praktische Durchführbarkeit im Vergleich zur konventionellen Zytologie, HPV-DNA-Diagnostik und histologischen Untersuchung überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 *Patientenkollektiv*

Die 249 verwendeten Präparate stammen aus dem Patientenkollektiv einer im Vorfeld durchgeführten Studie über HP-Viren. Es handelt sich um Zervixabstrichpräparate, die bei einer gynäkologischen Untersuchung in den Jahren 1998/99 in der Frauenklinik Großhadern der Ludwig-Maximilian-Universität München angefertigt wurden.

Bei den Patientinnen handelt es sich um Frauen im Alter zwischen 12 und 74 Jahren, bei denen im Rahmen der Dysplasiesprechstunde eine Exfoliativzytologie von Zervix und Portiooberfläche entnommen wurde. Patientinnen mit einem positiven HPV-DNA- Befund und/oder einem auffälligen zytologischen Abstrich (d.h. ab Pap IIID) erhielten zusätzlich eine kolposkopische Untersuchung.

Die Ergebnisse der zytologischen Untersuchung, Kolposkopie, Histologie, sowie des HPV-DNA-Testes, lagen bereits vor Durchführung dieser Studie vor.

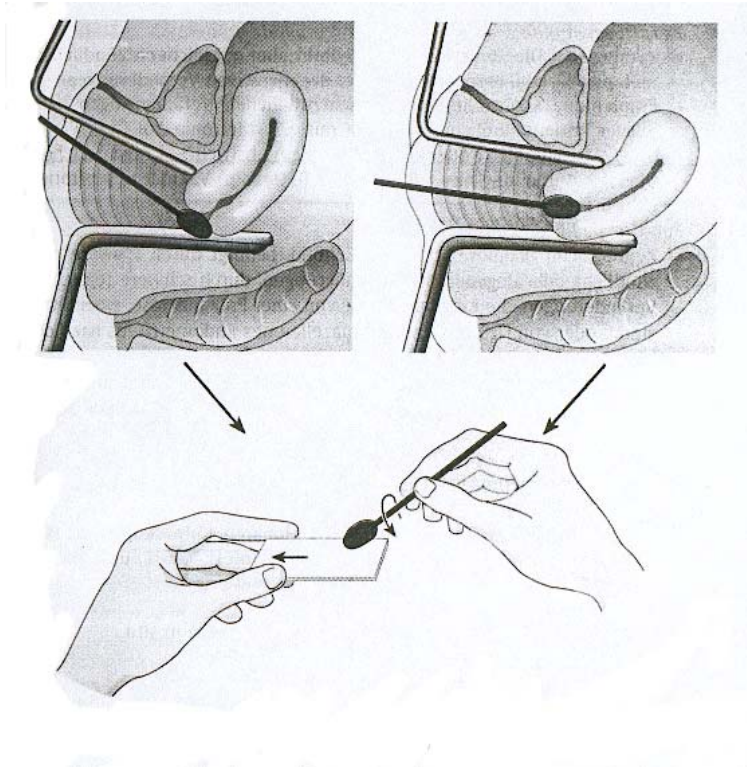


Abbildung 10: Abstrichentnahme von der Portiooberfläche und Abstrichentnahme aus dem Zervikalkanal. Ausstreichen auf dem Objektträger.

2.2 Testdurchführung

Bei dem Nachweissystem (Viroactiv®, Virofem Diagnostica, Wiesbaden, Deutschland) handelt es sich um ein neues auf dem Markt befindliches Verfahren zum Nachweis von HPV-Infektionen.

Die Grundlage des Testsystems bilden monoklonale Antikörper, die gegen typenspezifische Bereiche des Kapsidproteins L1 gerichtet sind. Die in diesem Test angewandten Antikörper richten sich nur gegen die High-risk-HPV-Typen 16,18,33,35,39,45,56 und 58.

Der Nachweis des Hüllproteins kann in histologischen sowie in zytologischen Präparaten durchgeführt werden. In der Zytologie können native (ungefärbte) oder nach Papanicolaou gefärbte Abstrich- und flüssigkeitsgestützte Dünnschichtpräparate verwendet werden. Durch Färbung des Zellkerns werden infizierte Zellen

nachgewiesen. Die Detektion einer Zelle im gesamten Präparat ist für eine positive HPV Befundung ausreichend.

Vorbereitung der Proben

Bei den verwendeten Präparaten handelte es sich um nach Papanicolaou gefärbte Zytologie-Abstriche, bei denen vor Testdurchführung die Deckgläser entfernt wurden. Dies wurde durch Einlegen in Lösungsmittel (Xylol 96%) über 3 bis 5 Tage erreicht.

Antigen-Demaskierung

Jeweils 20 Präparate und eine Positivkontrolle wurden in eine absteigende Alkohohlreihe (96%-70%-50%) für jeweils 10 Minuten gegeben, und anschließend in Aqua dest. rehydriert.

Daraufhin wurden sie in einer Küvette vollständig mit Zitratpuffer bedeckt und mit lose aufliegendem Deckel in einer Mikrowelle für 2 Minuten bei voller Leistung aufgeköcht und anschließend 15 Minuten bei halber Leistung warm gehalten.

Zum Abkühlen wurde die Küvette für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Durch diesen wichtigen Schritt wird ein Aufbrechen der Virushüllen erreicht und die Antigene den Antikörpern frei zugänglich gemacht.

Immunfärbung

Im nächsten Schritt wurden die Präparate zunächst für 5 Minuten in einem Waschpuffer (Tween 20-Lösung) geschwenkt und daraufhin jeweils mit einem Tropfen „Blocking – Reagenz“ (PBS/FCS-Lösung/ <0,1% NaN₃) benetzt.

Die Präparate wurden mit einem Deckglas eingedeckelt und für 5 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach dem Entfernen der Deckgläser wurde pro Präparat ein Tropfen High Risk-HPV-Antikörper (VAHP) (enthält <0,1% NaN₃) aufgetropft, wiederum eingedeckelt

und in einer feuchten Kammer entweder über Nacht bei Raumtemperatur, oder alternativ für 2 Stunden bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert.

Im folgenden Waschschrift wurden die Objektträger zweimal in jeweils frischem Waschpuffer bewegt. Die Deckgläser wurden dadurch automatisch abgespült.

Weitere 30 Minuten wurden die Präparate mit einem Tropfen Nachweis-Reagenz (A.P.-Antikörper-Konjugat) benetzt, eingedeckelt und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

In dieser zweiten Inkubationsphase heften sich Sekundärantikörper an. Diese sind mit Enzymen gekoppelt, welche durch die folgenden Schritte eine Farbreaktion verursachen.

Daraufhin folgte wiederum ein 5-minütiger Waschschrift in frischem Waschpuffer.

Die einzeln aus dem Waschpuffer entnommenen Objektträger wurden auf Zellstoff abgetropft und daraufhin mit einer vorher angefertigten Chromogen-Lösung bedeckt, um die Farbreaktion auszulösen.

Diese Chromogen-Lösung beinhaltet Chromogen A (Fuchsin-Lösung), Chromogen B (Aktivierungsreagenz / 1-5% Na-Nitrit) und Chromogen C (gepufferte Substrat-Lösung).

Es wurde wiederum ein Deckglas aufgebracht und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.

Nach Entfernen der Deckgläser wurden die Präparate zum Stoppen der Farbreaktion eine Minute lang in Aqua dest. gestellt.

Im Folgenden wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxin für 10-20 Sekunden durchgeführt, und anschließend durch 3-5-minütiges Abspülen unter laufendem Leitungswasser der Farbumschlag ins Blaue erreicht.

Abschließend mussten die Objektträger mit einem wässrigen Eindeckmedium (Aquatex Merck) mit Deckgläsern eingedeckt werden, um sie für die Auswertung zu konservieren.

2.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte per Lichtmikroskop bei 100 bzw. 400 facher Vergrößerung. Das vom High Risk-Antikörper erkannte Kapsidprotein der Papillomviren wird im Zytoplasma der Zelle hergestellt und anschließend in den Zellkern transportiert. Daher sind die Zellkerne rot gefärbt. Bei starker Expression des Proteins kann zusätzlich eine schwache Färbung des Zytoplasmas auftreten.

2.4 Zusammenfassung

- Der Abstrich wird auf einem Objektträger aufgebracht.
- Die Zellen werden fixiert und anschließend durch Hitzebehandlung denaturiert.
- Der Primärantikörper VAHP wird aufgetragen und inkubiert.
- Nachweisreagenz und Farbstoff werden zugegeben.
- Das gefärbte Präparat wird lichtmikroskopisch ausgewertet.

2.5 Benötigte Reagenzien und Geräte

Viroactiv© HPV High Risk Kit:

Packungsinhalt:

High Risk-Antikörper	2,5ml
Nachweisreagenz (AP-Antikörper-Konjugat)	2,5ml
Blockingreagenz (PBS/FCS-Lösung / < 0,1% NaN ₃)	2,5ml
Chromogen A (Fuchsin-Lösung)	0,8ml
Chromogen B (Aktivierungsreagenz / 1-5% Na-Nitrit)	0,8ml

Chromogen C (Gepufferte Substrat-Lösung)	12,0ml
Positiv-Kontrollen Zyto	5 Stück
Reaktionsgefäße (2ml)	10 Stück
Waschpuffer-Konzentrat (20fach PBS / Tween20)	125ml
Zitratpuffer-Konzentrat / Stammlösung A	27ml
Zitratpuffer-Konzentrat / Stammlösung B	123ml

Zusätzlich zum Viroactiv© Kit benötigte Produkte:

100 µl Pipette

Deckgläser

Plastikfärbeküvetten

Mikrowelle

Mayer´s oder Harris Hämatoxilin

96% Ethanol

96% Xylol

Eindeckmedium auf Wasserbasis (z.b. Aquatex von Merck)

Feuchte Kammer

entmineralisiertes Wasser

2-und 3-Liter-Gefäß (für Wasch- und Zitratpuffer)

Mikroskop

2.6 Datenauswertung und Statistik

Um eine genaue Datenerfassung zu ermöglichen, wurde eine Liste entworfen, mit deren Hilfe alle relevanten Angaben erfaßt werden konnten. Dies waren Angaben bezüglich des Geburtsdatums, Alters, Histologie, Zytologie, Kolposkopie, Viroactiv Test und Hybrid-Capture-Test.

Bei der statistischen Untersuchung wurden folgende konkrete Fragestellungen bearbeitet:

- Altersverteilung
- Prozentuale Verteilung der zytologischen-, kolposkopischen- und histologischen Ergebnisse
- Vergleich der Ergebnisse des Hybrid Capture Tests mit dem Viroactiv Test
- Sensitivität, Spezifität und negative prädiktive Werte der jeweiligen Tests

Um die diagnostische Wertigkeit eines Nachweisverfahrens (u.a. HPV - Test) für eine Erkrankung (d.h. Dysplasie bzw. für ein Karzinom) beurteilen zu können, wurde aus einer aus vier Feldern bestehenden Kontingenztabelle die Sensitivität (Wahrscheinlichkeit, daß eine Kranke auch tatsächlich ein positives Testergebnis aufweist [$TP/(TP+FN)$]) berechnet.

Die Spezifität (Wahrscheinlichkeit, daß eine Nicht - Kranke auch tatsächlich ein negatives Testergebnis aufweist [$TN/(FP+TN)$]) und der negative bzw. positive prädiktive Werte (der negative prädiktive Wert ist die bedingte Wahrscheinlichkeit, daß eine Erkrankung E nicht vorliegt unter der Bedingung, daß der diagnostische Test negativ ist [$PV+ = TP/(TP+FP)$] der positive prädiktive Wert ist die bedingte Wahrscheinlichkeit, daß eine Erkrankung E vorliegt unter der Bedingung, daß der diagnostische Test T positiv ist [$PV- = TN/(FN+TN)$]), konnten aus unseren Daten nicht berechnet werden, da wir nicht alle Patientinnen histologisch untersucht haben und daher das gesunde Kollektiv nicht genau angeben konnten.

Disease Test	Positiv	Negativ	Total
Positiv	TP	FP	TP+FP
Negativ	FN	TN	FN+TN
Total	TP+FN	FP+TN	TP+FP+FN+TN

Tabelle 7: Exemplarische Kontingenztabelle zur Berechnung der Spezifität, Sensitivität, sowie negativem und positivem prädiktiven Wert

TP = true positive; FP = false positive; FN = false negative; TN = true negative

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Gesamtkollektivs

Das Patientinnenkollektiv stammt aus der Dysplasiesprechstunde der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikum Großhadern.

Im Zeitraum von Dezember 1998 bis einschließlich Juli 1999 haben 249 Patientinnen an einer HPV-DNA-Untersuchung teilgenommen. Bei dieser Untersuchung wurden eine zytologische, histologische und kolposkopische Untersuchung sowie ein HPV-DNA-Nachweis durchgeführt und standen als Vergleichswerte für die aktuelle Studie zur Verfügung.

Der Altersmedian lag bei 28 Lebensjahren.

Die jüngste Patientin war 12, die älteste 74 Jahre alt.

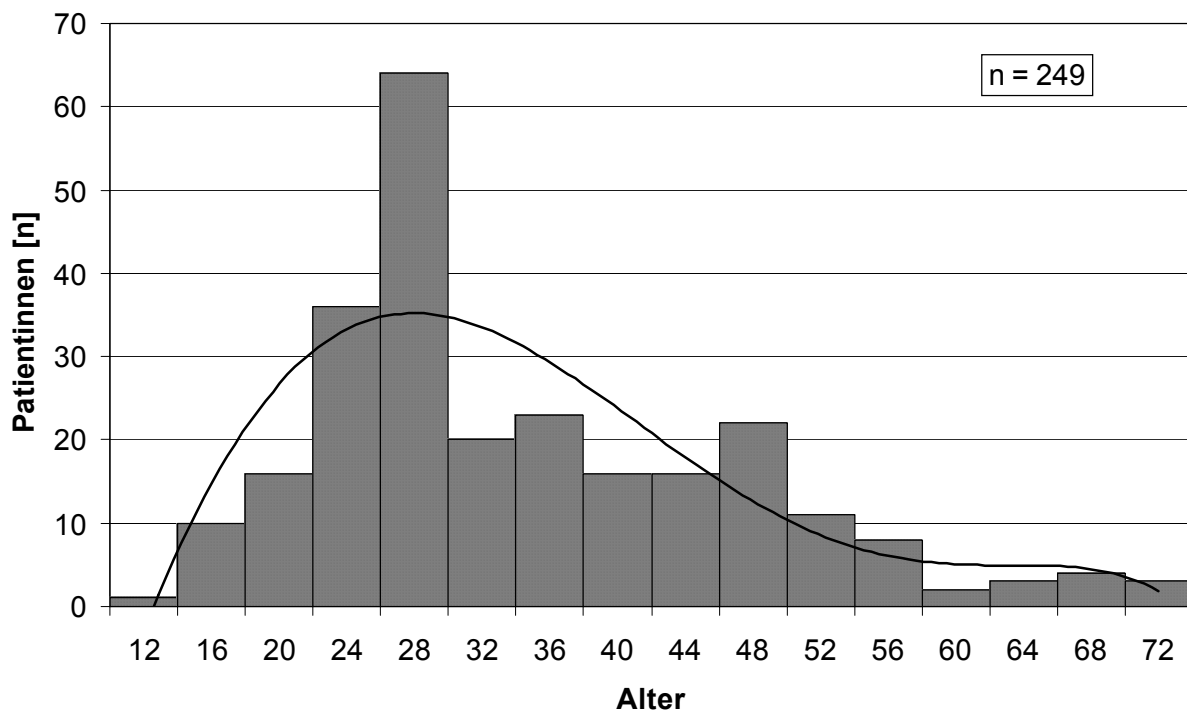


Abbildung 11: Altersverteilung des Patientinnenkollektivs der Studie

3.2 Zytologie

Die zytologische Untersuchung ergab bei 120 Frauen (48%) einen unauffälligen Befund, welches in der gynäkologischen Terminologie als Pap I/II bezeichnet wird. Zwei Präparate (1%) stellten sich als unbrauchbare Zellabstriche heraus und wurden als Pap 0 kategorisiert.

Bei 38 Patientinnen (15%) wurde ein kontrollbedürftiger Befund im Sinne eines Pap IIw diagnostiziert.

Ein Pap III als abklärungsbedürftigen Befund, stellte sich bei 15 Patientinnen (6%) heraus.

Der zytologische Befund eines Pap IVa wurde bei 28 Patientinnen (11%) ermittelt. Drei Prozent und somit sieben Frauen wiesen einen Verdacht auf eine zervikale intraepitheliale Neoplasie Grad 3 auf mit zytologischen Hinweisen für ein mögliches Vorliegen eines bereits invasiven Karzinoms (Pap IVb).

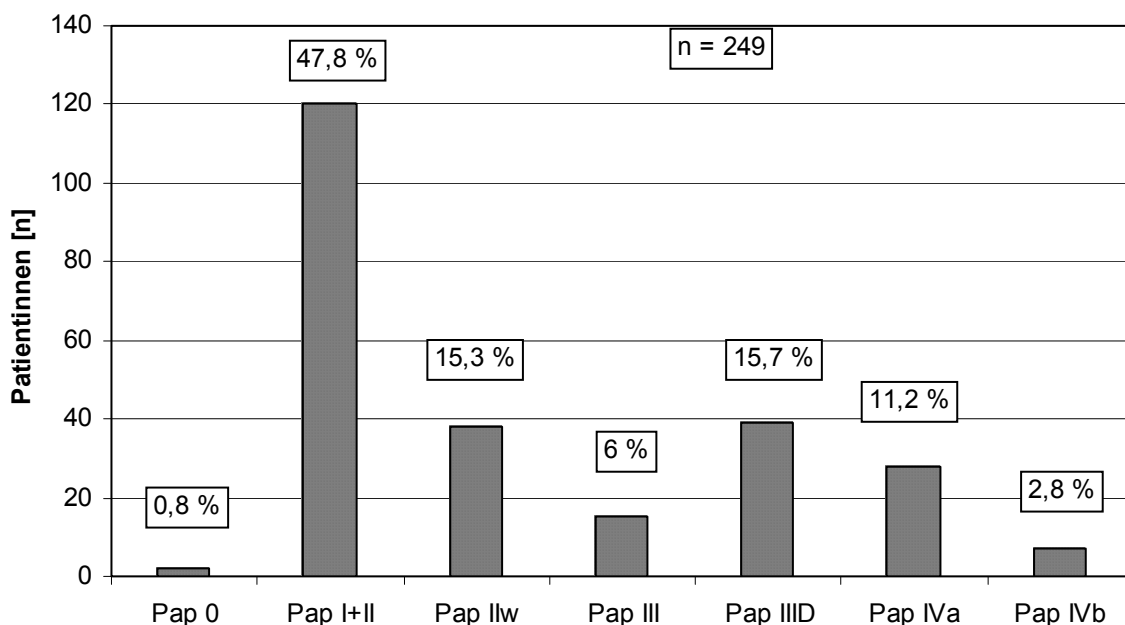


Abbildung 12: Veränderung der zervikalen Zellen (Pap 0-IV) in der zytologischen Untersuchung der vorliegenden Proben (n=249) absolut und prozentual.

3.3 Kolposkopie

Insgesamt 155 Patientinnen wurden aufgrund der zytologischen Befunde zu einer kolposkopischen Untersuchung herangezogen (62% vom Gesamtkollektiv). Davon stellten sich 57 als unauffällig heraus (23%), wohingegen 98 Untersuchungen einen auffälligen kolposkopischen Befund aufwiesen (49%).

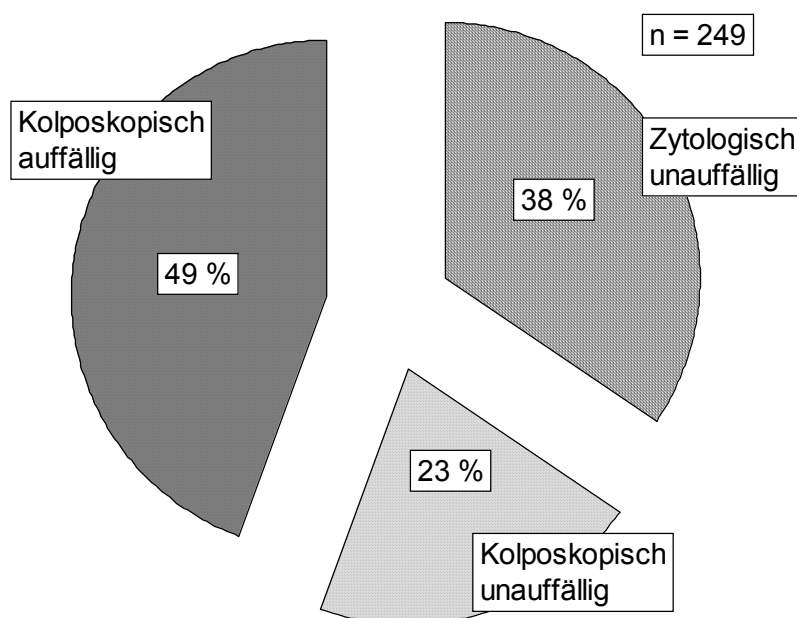


Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der Befunde nach zytologischer (n=249) und kolposkopischer Untersuchung der zytologisch auffälligen Proben (n=155).

3.4 Histologie

Bei insgesamt 100 Patientinnen wurde aufgrund der zytologischen und kolposkopischen Befunde die Entnahme einer Gewebeprobe mit histologischer Untersuchung als weiterführende Diagnostik für notwendig empfunden; dies entspricht 40% des Gesamtkollektivs.

Von diesen Knipsbiopaten wiesen 28 einen negativen (28%) und 72 einen positiven histologischen Befund auf (72%).

Unter den positiven histologischen Befunden befanden sich 66 zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN), welche sich in 21 leichte Dysplasien (CIN 1), 18 mäßige (CIN 2), und 27 schwere Dysplasien (CIN 3) gliederten.

Eine vulväre Dysplasie (VIN) wiesen vier Gewebeproben auf, weitere zwei eine Dysplasie im Bereich der Vagina (VAIN).

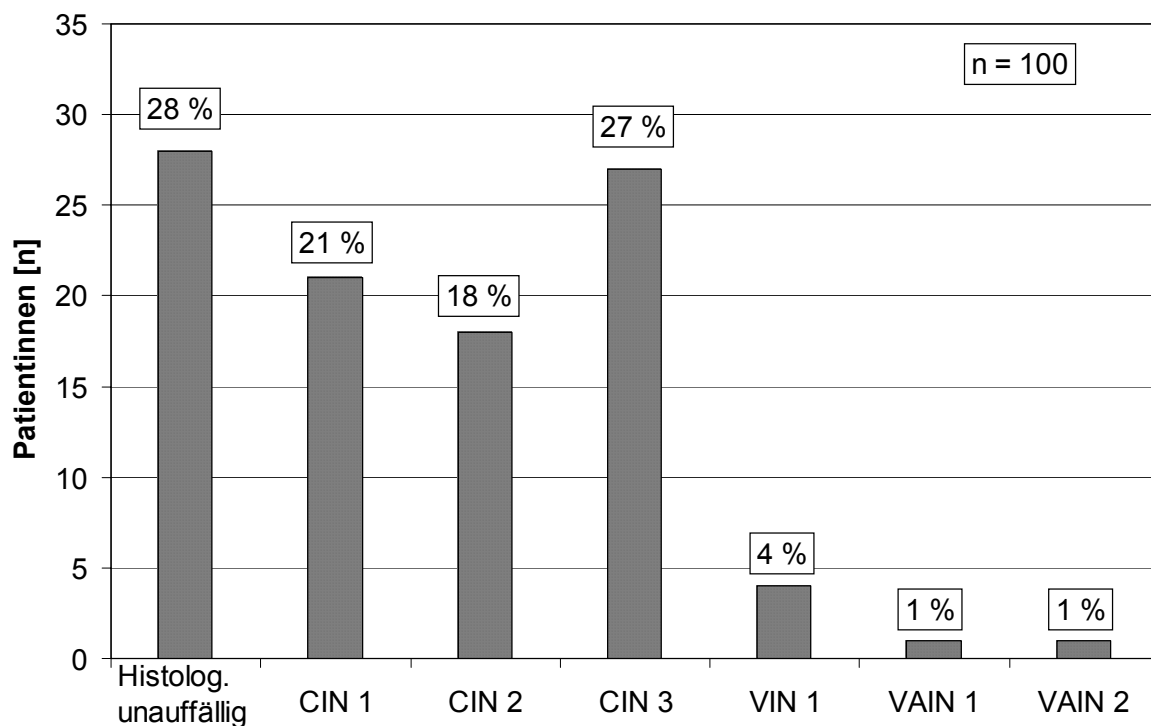


Abbildung 14: Veränderung der zervikalen Zellen in der histologischen Untersuchung der kolposkopisch verdächtigen vorliegenden Proben (n=100) absolut und prozentual.

3.5 HPV-DNA-Nachweis

Der bereits als Hybrid-Capture-Assay durchgeführte DNA-Nachweis ergab in 158 Fällen (64%) einen negativen Befund.

Bei 91 Tests wurde HPV-DNA nachgewiesen (36%).

HCII-Test	n = 249	%
positiv	91	36%
negativ	158	64%

Tabelle 8: Ergebnis des HCII-Tests aller vorliegenden Proben (n=249) absolut und prozentual.

3.6 Viroactiv-Nachweis

Bei dem Antigen-Nachweis der Firma Viroactiv, der in dieser Studie vergleichend bei allen Patientinnen durchgeführt wurde, lieferten 189 Proben (76%) ein negatives Ergebnis. Bei 60 Präparaten (24%) konnte mit diesem Test eine HPV-Infektion nachgewiesen werden.

Viroactiv Test	n = 249	%
positiv	60	24%
negativ	189	76%

Tabelle 9: Ergebnis des Viroactiv-Tests aller vorliegenden Proben (n=249) absolut und prozentual.

3.7 Vergleiche

3.7.1 Vergleich Viroactiv / HCII

Zieht man den in dieser Studie zum Vergleich durchgeführten Viroactiv- Nachweis zu den Ergebnissen des Hybrid-Capture-Assay heran, kam es in 144 Fällen und somit 58% zu einer Übereinstimmung über das Vorliegen einer HPV-Infektion. 121 Präparate (49%) wiesen sowohl mittels HCII, als auch durch den Viroactiv-Test kein Virus nach. Positiv fielen beide Tests in 23 Fällen und somit 9% aus.

Bei 105 Patientinnen (42%) ergaben die beiden Tests gegensätzliche Aussagen. In 37 Fällen und somit 15% ergab der Viroactiv-Test ein positives und der HCII-Test ein negatives Ergebnis. 68 (27%) Proben waren durch den HCII-Test als virushaltig befunden, der Viroactiv-Test fiel im Gegensatz dazu negativ aus.

Berechnet man die Sensitivität (= Wahrscheinlichkeit, dass eine Kranke auch tatsächlich ein positives Testergebnis aufweist), Spezifität (= Wahrscheinlichkeit, dass eine Nicht-Kranke auch tatsächlich ein negatives Testergebnis aufweist) und den negativen prädiktiven Wert des Viroactiv-Testes anhand der HCII-Ergebnisse so erlangt er eine Sensitivität von 24%, die Spezifität beläuft sich auf 76% und der negative prädiktive Wert liegt bei 38%.

n = 249	Viroactiv	Viroactiv
	positiv	negativ
HCII		
positiv	23 (9%)	68 (27%)
HCII		
negativ	37 (15%)	121 (49%)

Tabelle 10: Vergleich der Ergebnisse des Viroactiv-Tests und des HCII-Tests absolut und prozentual.

3.7.2 Viroactiv/HCII im Vergleich zur Zytologie

Betrachtet man die Ergebnisse der beiden Virusnachweise in Bezug auf die zytologischen Befunde, liegt bei den unauffälligen Zytologiepräparaten (Pap I/II) eine HPV-Infektion laut Viroactiv-Test in 24% der Fälle vor. Der Hybrid-Capture-Assay weist 13% der Präparate als Virusinfiziert nach. Bei den als Pap IIw kategorisierten Präparaten sind laut Viroactiv-Test 18% infiziert; der HCII-Test weist 34% in dieser Kategorie als Virusträger nach. Pap III befundete Abstriche weisen in der Viroactiv-Anfärbung in 40%, und mittels HCII in 46% der Fälle HPV nach. 28% der Pap IIID Präparate weisen in der Viroactiv-Färbung HP-Virus nach, wohingegen 66% des HCII-Tests Virus aufweisen. Bei den als Pap IVa befundeten Patientinnen weist der Viroactiv-Test in 17% eine HPV-Infektion nach. Der HCII-Nachweis kommt in diesem Fall auf 82% Virus-Nachweis. Eine gleichzeitige Virusinfektion bei den Pap IVb Präparaten stellte Viroactiv in 29% der Fälle fest, der HCII-Nachweis in 57% aller Präparate.

Die Sensitivität des Viroactiv-Tests in Bezug auf die zytologischen Ergebnisse beläuft sich auf 27%. Im Vergleich dazu weist der HCII-Test eine Sensitivität von 57% auf.

Bei der Spezifität erzielen die Werte beim Viroaktiv-Test 78% gegen 85% des HCII-Test. Beim negativen prädiktiven Wert kommt der Viroaktiv-Test auf 40%; der HCII auf 80%.

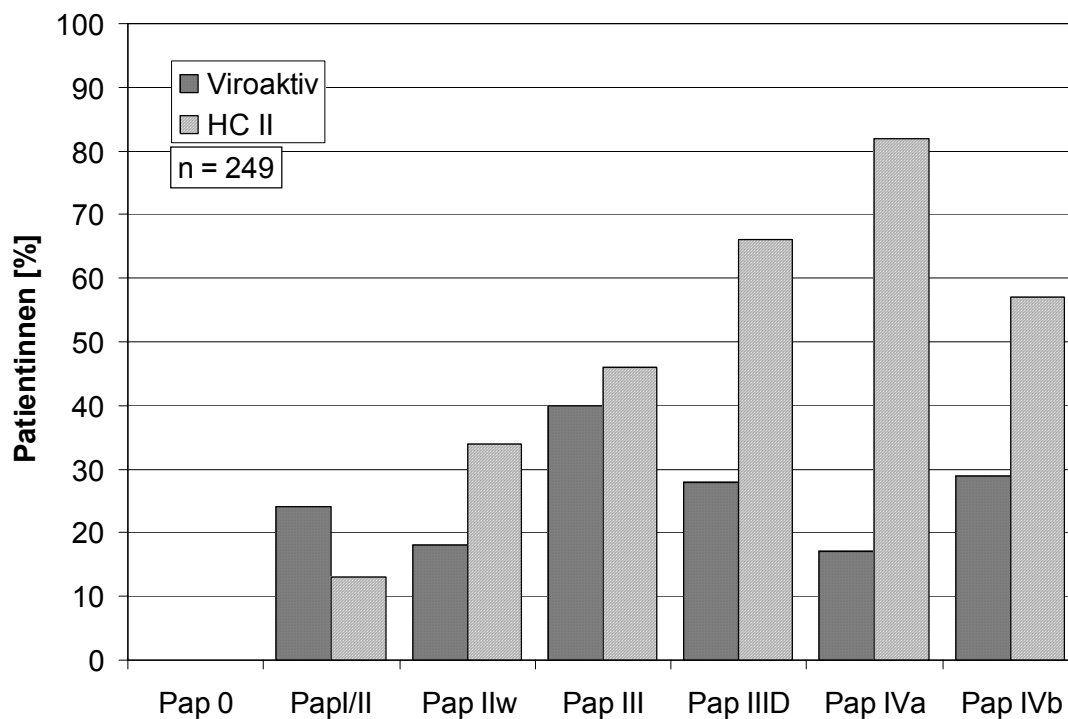


Abbildung 15: Prozentual positive Befunde des Viroaktiv- bzw. HCII-Tests in den zytologisch vorliegenden Kategorien (Pap I-IV, n=249).

3.7.3 Viroaktiv/HCII im Vergleich zur Kolposkopie

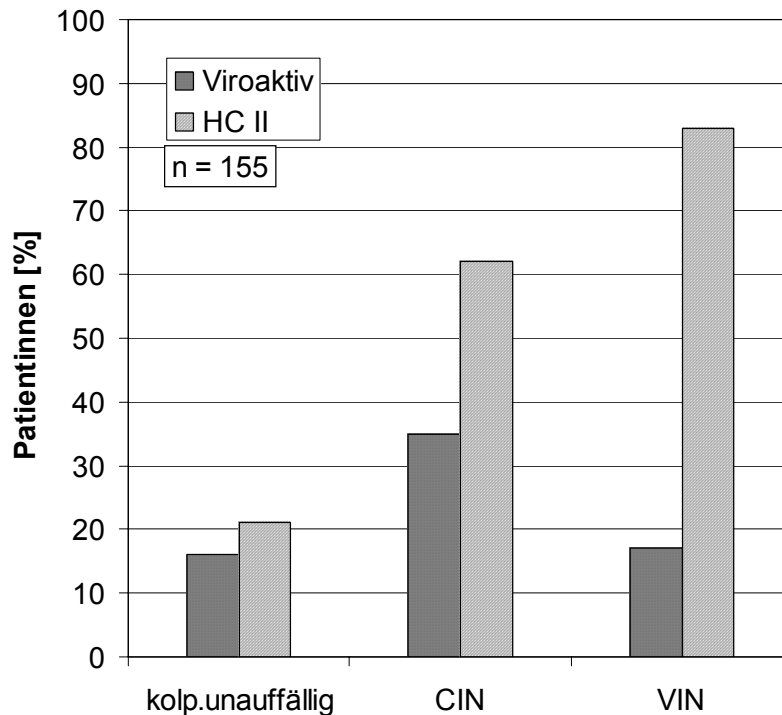


Abbildung 16: Prozentual positive Befunde des Viroaktiv- bzw. HCII-Tests in den kolposkopisch vorliegenden Kategorien (CIN und VIN, n=155).

Bei denen zur kolposkopischen Untersuchung herangezogenen Patientinnen, die keine Veränderungen aufweisen, führt die Viroaktiv-Färbung in 16% zu einem positiven Virus-Nachweis, der HCII-Test in 21%.

Die als CIN befundenen kolposkopischen Präparate weisen durch Viroaktiv-Färbung in 35% einen viralen Befall und durch den HCII-Test in 62% eine Virusbeteiligung auf.

Die Patientinnen, bei denen eine VIN kolposkopisch nachgewiesen wurde sind laut Viroaktiv-Nachweis nur zu 17% mit HPV infiziert; der HCII-Test weist eine Virusexistenz von 83% nach.

Somit lässt sich beim Viroaktiv-Nachweis eine Sensitivität von 30% berechnen. Der HCII-Test weist in Bezug auf die kolposkopischen Daten eine Sensitivität von 67% auf. Die Spezifität des Viroaktiv-Test erreicht 76% und beim HCII-Test lassen sich

78% berechnen. Der negative prädiktive Wert beläuft sich beim Viroactiv-Test auf 76% und beim HCII-Test erreicht er 84%.

3.7.4 Vergleich Viroactiv/HCII mit der Histologie

Bei den histologischen Untersuchungen, die eine leichte zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN 1) feststellten, wurde mittels Viroactiv-Nachweis in 19% der Fälle eine Vergesellschaftung mit dem HP-Virus ermittelt. Der HCII-Test ergab bei den gleichen Präparaten in 52% der Fälle eine HPV-Infektion.

50% der als CIN 2 befundenen Histologiepräparate weisen laut Viroactiv das Vorliegen von Virus auf. Der HCII-Test stellt dagegen eine Befallsdichte von 89% fest.

Die als CIN 3 kategorisierten Präparate weisen mittels Viroactiv-Färbung in 15% der Fälle HP-Virus nach. Der HCII-Nachweis fiel in 85% positiv aus.

Bei den Vulvären Intraepithelialen Neoplasien liegen der Viroactiv-Nachweis und der HCII-Test mit jeweils 75% in vergleichbaren Bereichen, wohingegen bei den als Vaginale Intraepitheliale Neoplasie befundenen Präparaten der Viroactiv-Test keine (0%) und der HCII alle (100%) als virusinfiziert nachweist.

Die Sensitivität der beiden Virusnachweise beläuft sich in Bezug auf die Histologiedaten beim Viroactiv-Test auf 27% und beim HCII-Test auf 77%.

Bei der Spezifität liegt der Viroactiv-Test bei 64% und der HCII-Nachweis bei 53%. Beim negativen prädiktiven Wert erreicht der Viroactiv-Test 66% und der HCII-Test 81%.

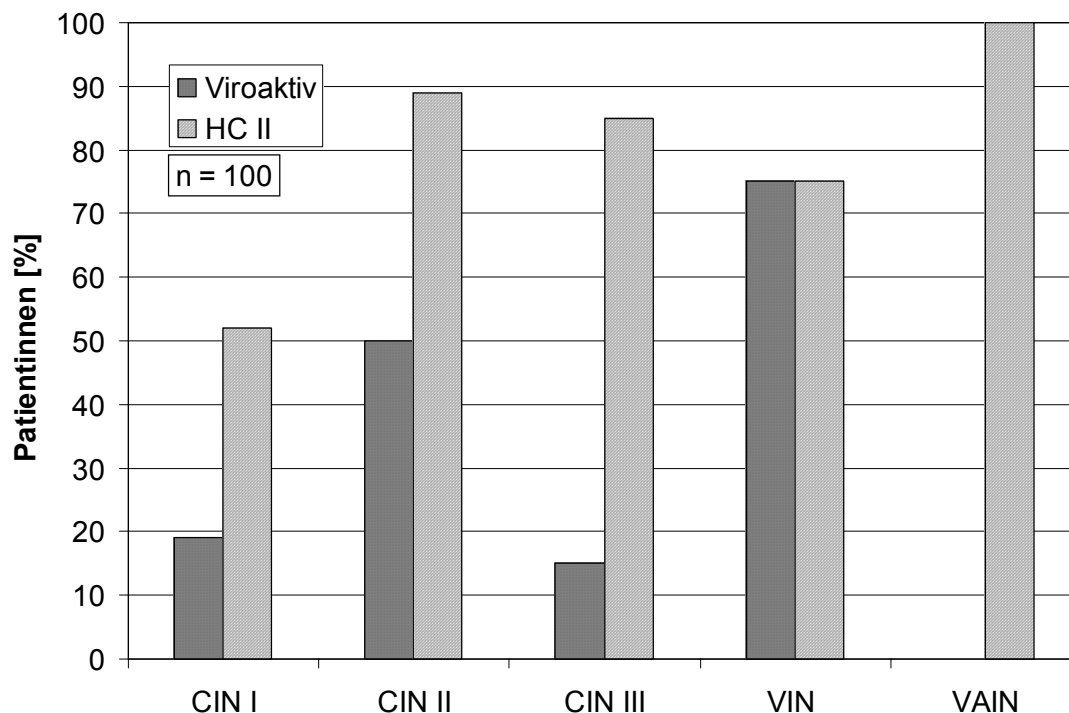


Abbildung 17: Prozentual positive Befunde des Viroactiv- bzw. HCII-Tests in den histologisch vorliegenden Kategorien (CIN 1-3, VIN, VAIN, n=100).

3.7.5 Vergleich der Viroactiv/HCII Ergebnisse speziell bei CIN 1 Befunden

CIN 1 n=21	Viroactiv positiv	Viroactiv negativ	Total
HCII positiv	3	8	11 positiv / 52%
HCII negativ	1	9	10 negativ
Total	4 positiv / 19%	17 negativ	

Tabelle 11: Vergleich der Testergebnisse des Viroactiv- bzw HCII-Tests bei allen CIN1-Patientinnen

Zieht man nur die Virusnachweis-Ergebnisse der als CIN 1 befundenen histologisch untersuchten Präparate zum Vergleich heran, so ergibt sich bei 52% der Tests eine Übereinstimmung der Ergebnisse, 48% ergeben unterschiedliche Befunde. Bei den

elf Patientinnen die einen positiven HCII-Test aufwiesen, ergaben im Viroactiv-Test drei ein positives und acht ein negatives Ergebnis. Bei den zehn negativen HCII-Tests waren ebenfalls neun im Viroactiv-Test negativ, einer dagegen positiv. Insgesamt ergab der Viroactiv-Test vier positive und 17 negative Virus-Nachweise. Somit weist der HCII-Test in 52% aller CIN1 Präparate eine HPV-Beteiligung nach. Der Viroactiv-Test kommt bei 19% auf einen HPV-Nachweis.

		Zytologie	Histologie	Kolposkopie
Sensitivität	Viroactiv	27%	27%%	30%
	HCII	57%	77%	67%
Spezifität	Viroactiv	78%	64%	84%
	HCII	85%	53%	78%
neg. prädiktiver Wert	Viroactiv	40%	66%	76%
	HCII	80%	81%	84%

Tabelle 12: Sensitivität, Spezifität und negativer prädiktiver Wert des Viroactiv- bzw. HCII-Tests in Bezug auf die Befunde der Zytologie, Histologie und Kolposkopie.

3.8 Altersverteilung der HPV-Infektionen

Zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der Testergebnisse in Abhängigkeit des Alters wurde das Patientinnenkollektiv in zwei Altersgruppen eingeteilt. Da insbesondere Frauen im reproduktiven Alter bis 40 Jahre von neoplastischen Prozessen der Cervix uteri betroffen sind (Hillemanns et al., 1997) scheint es sinnvoll, diese Altersgruppe vergleichend zu den Patientinnen ab 40 Jahre zu betrachten.

Betrachtet man die HPV-Infektionsrate der beiden Gruppen, so sind bei den 170 Patientinnen der Altersgruppe bis 39 laut Viroactiv-Test 24% (40 Patientinnen) mit HPV infiziert. Der HCII-Test weist bei 44% (75 Patientinnen) HPV nach.

In der zweiten Gruppe (40 Jahre und älter) ergibt der Viroactiv-Test eine 25%ige Infektionsrate (20 Patientinnen). Der HCII-Test weist bei 20% der 79 Patientinnen ein Virus nach.

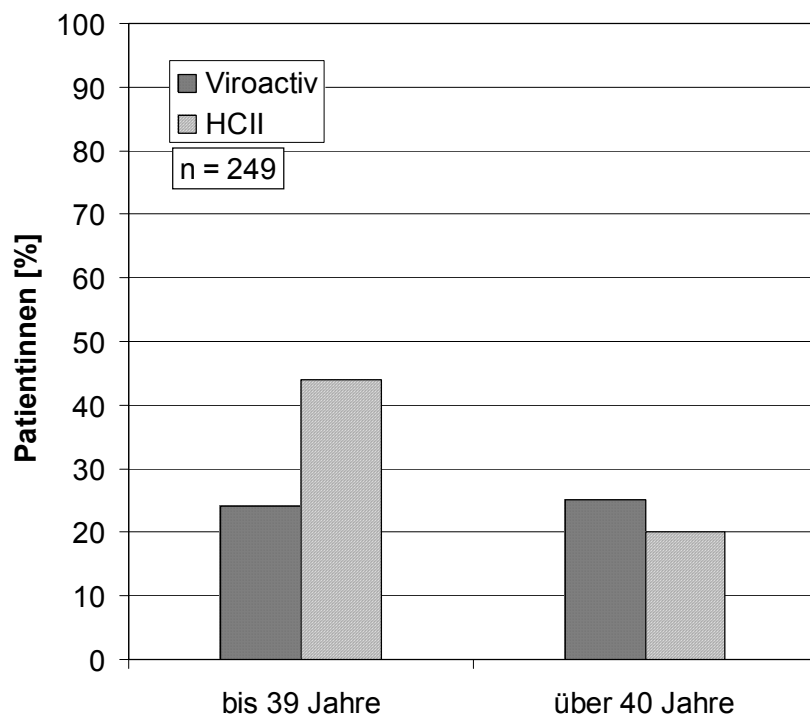


Abbildung 18: Vergleich der positiven Testergebnisse des Viroactiv-/ HCII-Tests in Abhängigkeit des Patientinnenalters in Prozent (n=249).

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Das Zervixkarzinom ist der zweithäufigste bösartige Tumor der Frau weltweit mit fast einer halben Millionen Neuerkrankungen pro Jahr. In den Entwicklungsländern gilt das Zervixkarzinom sogar als der häufigste Tumor, an dem Frauen sterben.

Im letzten Jahrzehnt trat eine rasante Entwicklung in der Erforschung von Ätiologie und Pathogenese, sowie in Diagnostik und Therapie der intraepithelialen Neoplasien des unteren Genitaltrakts, ein. Vieles hat inzwischen Eingang in die klinische Routine gefunden (Hillemanns 2000).

Als Hauptrisikofaktor in der Entstehung des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen hat sich das Humane Papillomvirus durch zahlreiche Studien bestätigt. Es stellte sich heraus, dass verschiedene HPV-Typen-Gruppen mit einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) unterschiedlichen Schweregrades assoziiert sind.

Aus den über 150 bekannten Humanen Papillomviren lassen sich zwei Gruppen mit unterschiedlichem onkogenem Potential bilden. HPV 6,11,42,43,44 u.a. besitzen ein niedriges onkogenes Potential und sind hauptsächlich mit fakultativen Präkanzerosen wie Kondylomen und geringgradigen intraepithelialen Veränderungen (CIN 1) assoziiert. Sie sind fast nie bei einem invasiven Zervixkarzinom nachzuweisen. Als essentielle Voraussetzung für die Entstehung von mehr als 95% aller invasiver Karzinome und 90% der hochgradigen Präkanzerosen der Cervix uteri (CIN) werden die hochonkogenen HP-Viren vom Typ 16,18,33,35,39,51,52 und 56 gezählt (Bosch et al, 1995, Walboomers 1999).

Weitere Risikofaktoren für die Entstehung des Zervixkarzinoms stellen in erster Linie Nikotinabusus, schlechte Ernährung, sowie immunsupprimierende Krankheiten dar.

Die bisher etablierte Krebsfrüherkennung des Gebärmutterhalskrebses und seiner Vorstufen, die gynäkologische Routineuntersuchung, basiert auf der zytologischen Sceeninguntersuchung eines Zervixabstriches. Bei positiven Screeningbefunden sollte die weiterführende Differentialdiagnostik mittels Kolposkopie erfolgen. In dieser so genannten „Triple–Diagnostik“ schließt sich eine gezielte Knipsbiopsie mit histologischer Untersuchung an, falls die Kolposkopie positiv ausfällt. Die

Kolposkopie hat eine hohe Sensitivität (90%), ist jedoch mit einer deutlich geringeren Spezifität von 50% bis 60% behaftet, welches eine verhältnismäßig hohe Rate an Knipsbiopsien mit unauffälliger Histologie zur Folge hat.

Daher sind neue diagnostische Methoden zur besseren Abklärung der CIN gesucht. Die aufgezeigten Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen karzinogenen Papillomviren und intraepithelialen Neoplasien lassen neue Strategien in der Krebsvorsorge erkennen.

Ein zuverlässiger Nachweis der HPV-Infektion war bis jetzt nur mittels molekularbiologischen Methoden möglich. Hierzu zählt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Hybrid-Capture-II-Test (HCII), wobei der PCR- Nachweis wegen zu großem apparativen Aufwand und hohen Kosten nicht für die Routinediagnostik in Frage kommt.

Neben diesen Verfahren ist seit kurzem der Antigennachweis Viroactiv auf dem Markt. Hierbei handelt es sich um monoklonale Antikörper, die gegen typenspezifische Bereiche des Virus-Kapsidproteins L1 gerichtet sind. Sie sollen sich sowohl zum Screening als auch zur Typisierung in „high risk“ und „low risk“ HPV-Infektionen eignen. Im Gegensatz zu DNA-Nachweisen, bei denen zwischen latenten und aktiven, klinisch relevanten Infektionen nicht unterschieden werden kann, besteht der Vorteil im ausschließlichen Nachweis von aktiven Stadien der Virusvermehrung. Mit diesem Nachweisverfahren können zytologische sowie histologische Proben routinemäßig untersucht werden.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Durchführbarkeit dieses neuen Testverfahrens sowie Vergleiche zu Zytologie, Kolposkopie, Histologie und dem DNA-Nachweis mittels Hybrid-Capture-II zu evaluieren.

4.2 Patientenkollektiv

Die Studie greift auf ein bereits im Vorfeld bearbeitetes Patientenkollektiv mit vollständig durchgeführter zytologischer Untersuchung, sowie DNA-Nachweis mittels

Hybrid-Capture-II-Test, zurück. Einen kontrollbedürftigen zytologischen Befund wiesen 51% der 249 Patientinnen auf.

Bei 155 Patientinnen (=62% des Gesamtkollektivs) wurde eine kolposkopische Untersuchung durchgeführt, 63% davon wiesen einen auffälligen Befund auf.

Eine histologische Untersuchung wurde bei 100 Patientinnen durchgeführt, dies entspricht 40% des Gesamtkollektivs. Dabei wurden 28% negativ befundet. Die histologisch positiv bewerteten Proben teilen sich in zervikale, vulväre sowie vaginale Neoplasien auf.

Die Patientinnen wurden rein zufällig, unabhängig vom Alter in die Studie aufgenommen und spiegeln das breite Spektrum der Dysplasiesprechstunde der Frauen-Poliklinik wieder. Die Daten können jedoch nicht auf die Gesamtbevölkerung übertragen werden, da es sich um ein Hochrisiko-Patientinnenkollektiv handelt. Es erfolgte keine weitere Selektion nach Risikofaktoren, wie z.B. Angaben über Partnerwechsel, sexuelle Gewohnheiten, erster sexueller Kontakt u.a.

4.2.1 Untersuchungsmethoden

Die Zervixabstriche stammen aus den Archiven des zytologischen Labors der Frauenklinik Großhadern der Jahre 1998/99. Die Proben waren bereits zur zytologischen Untersuchung nach Papanicolaou gefärbt und mit einem Eindeckmedium mit Deckglas versehen. Somit mussten die Proben zu Beginn 3-5 Tage in Xylol 96% eingelegt werden, um die Deckgläser zu entfernen. Dieser Vorgang beinhaltet die Gefahr des Abschwemmens einer gewissen Anzahl von Zervixzellen. Weiterhin muss das Alter der Präparate in Betracht gezogen werden, es grenzt in manchen Fällen bis an 5 Jahre. Diesbezüglich räumt der Hersteller des Testverfahrens allerdings Unbedenklichkeit ein. Laut Literaturangaben sind schon Präparate mit einem Alter von 14 Jahren erfolgreich gefärbt worden (Neumann und Kolhoff 2001). Es bleibt jedoch zu beurteilen, ob sich dies auf Einzelfälle bezieht und sich ein generelles Alter der Präparate auf die Sensitivität auswirkt.

Ein sehr wichtiger Schritt zur Testdurchführung ist das Aufbrechen der Virushüllen. Dies wurde durch Kochen in einem Zitratpuffer erreicht. Dieser Vorgang erfolgt in der

Mikrowelle und ist in Bezug auf die Hitzeeinwirkung schwer steuerbar. Zu starkes Kochen beinhaltet erneut die Gefahr des Abschwemmens einzelner Zervixzellen. Eine zu geringe Hitze bricht jedoch die Virushüllen nicht auf und eine Exposition der Kapsidproteine, die eine Grundvoraussetzung für den Antikörpernachweis darstellt, findet nicht statt.

In den folgenden Schritten wurde in der ersten Inkubation die eigentliche Antigen-Antikörper-Reaktion durchgeführt. Überschüssige ungebundene Antikörper wurden durch Waschen entfernt und die Färbereaktion im Rahmen einer zweiten Inkubationsphase mit Hilfe eines Sekundärantikörpers durchgeführt. An diesen Sekundärantikörper sind Enzyme gekoppelt, die eine Farbreaktion hervorrufen.

Der vollständige Färbevorgang beinhaltet insgesamt 10 Schritte, die ein erneutes Eintauchen bzw. Waschen der Objektträger in einer anderen Flüssigkeit verlangen.

Wie bereits erwähnt, birgt jedoch jeder dieser Vorgänge die Gefahr eines weiteren Verlusts der auf dem Objektträger befindlichen Zervixzellen.

Die gesamte Durchführung der vielen einzelnen Schritte ist äußerst arbeits- und zeitintensiv. Ein Arbeitsdurchgang mit nur 20 Objektträgern dauert in etwa fünf Stunden.

Es wurde bei jedem Färbedurchgang mit den 20 Präparaten eine Positivkontrolle eingefärbt um eventuelle Fehler bei den Arbeitsschritten aufzudecken. Alle Positivkontrollen wiesen die erwartete Rotfärbung der Zellen auf und bewiesen somit eine korrekte Durchführung des Nachweisprozedere.

Die Auswertung der Präparate erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Positiv gewertet werden nach Testanleitung alle Zervixzellen, deren Zellkern rot angefärbt sind. Auch das Vorliegen einer einzelnen gefärbten Zelle reicht für einen positiven Befund aus.

In Praxi stellte sich die Auswertung jedoch als nicht so eindeutig und einfach heraus. In vielen Präparaten färbten sich nicht nur die Kerne sondern auch das Zytoplasma an. Außerdem erschienen viele Fremdpartikel sowie Nicht-Zervixzellen (Leukozyten etc.) mit einer eindeutigen Rotfärbung.

Diese Aspekte, sowie der hohe zeitintensive Aufwand beim Mikroskopieren (mindestens 10-15 min. pro Präparat) werfen Vorwürfe ähnlich denen der Zytologie auf. Bei beiden Screening- Methoden muss jeder Abstrich gründlich durchgemustert

werden, welches einen hohen personellen Aufwand verursacht. Hinzu kommt, dass die Qualität der Befundung von der Qualifikation und der Verfassung des Gutachters abhängt. Auch die für die Beurteilung der Qualität eines Screeningtests entscheidende Reproduzierbarkeit sowie die Sensitivitäts- und Spezifitätsrate fielen, ähnlich der Zytologie, schlecht aus. Gern wird in diesem Zusammenhang die Formel $2/3$ Abnahmefehler und $1/3$ Interpretationsfehler angegeben (Glösser 1996). Diese Vorstellung entbehrt jedoch einer wissenschaftlichen Grundlage.

Alles in allem erwies sich der Viroactiv-Test in dieser Studie, in seiner Durchführung und Auswertung, als unzureichend alltagstauglich und nicht einfach durchführbar. Wie sich der Virusnachweis jedoch bei frisch entnommenen Zervixabstrichen verhält, lässt sich durch diese Studie nicht beurteilen und bedarf weiterer Abklärung.

4.3 Ergebnisse der Test-Daten

4.3.1 Vergleich Viroactiv / HCII

Zieht man die Ergebnisse des Viroactiv-Tests zu den vorhandenen Daten des Hybrid-Capture-Assay heran, so zeigt schon der direkte Vergleich der Anzahl als positiv detektierten Proben eine erhebliche Diskrepanz. Der HCII-Test weist bei 91 (36%) HP-Virus nach, der Viroactiv-Test nur bei 60 Proben (24%). Berücksichtigt man die Tatsache, dass der Viroactiv-Test durch seine speziellen Antikörper nur die aktiven, noch im Replikationszyklus befindlichen HPV-Infektionen nachweist, der HCII aber auch latentinfizierte, wären diese Daten vertretbar.

Sucht man nun jedoch die übereinstimmend sowohl im Viroactiv-Test positiv erscheinenden als auch die im HCII-Test heraus, so kommt man nur mehr auf 23 Patientinnen, dies macht lediglich 9% des Gesamtkollektiv aus. Gerade die 15% (37 Patientinnen) die einen positiven Viroactiv-Test aber einen negativen HCII-Test aufweisen, sind nicht zu erklären, da eigentlich alle durch den Viroactiv-Test positiv getesteten auch im HCII-Test als positiv erscheinen müssten. Die Ursache der falsch negativen Ergebnisse des HCII-Test begründen Neumann et al. 2001 in der Nachweisgrenze des HCII. Dieser Test benötigt nach Herstellerangaben ca. 5000

Viruskopien für ein positives Signal und ist in der Routineanwendung ein sehr sensibles Testverfahren vergleichbar der PCR. Die Nachweisgrenze des Viroactiv-Testes liegt in einer ähnlichen Größenordnung, aber durch den Erhalt der Morphologie der Zellen verbleibt das Kapsidprotein in konzentrierter Form im Zellkern und wird nicht, wie für DNA-Nachweise (HCII) üblich, auf das gesamte Probenvolumen verteilt und dadurch verdünnt; ein methodisches Problem, das zu den falsch negativen Ergebnissen des HCII führt. Ob dies wirklich der Grund für die gegensätzlichen Testaussagen ist, lässt sich nicht eindeutig beweisen und bedarf somit weiterer Abklärung.

Die weiteren 27% (68 Patientinnen) die einen negativen Viroactiv-Test und einen positiven HCII-Test aufweisen, könnten als latente Virusinfektionen eingestuft werden, die zwar durch den HCII-Test nachgewiesen werden, jedoch im Viroactiv-Test negativ erscheinen.

Zieht man nun in Betracht, dass der HCII-Test als zugelassener FDA Test mit einer nachgewiesenen Sensitivität von über 98% bei mindestens mässiggradigen Dysplasien (Böhmer et al., 2003; Iftner et al., 2000; Clavel et al., 2001) als „golden standard“ angesehen werden kann, weist der Viroactiv-Test mit seiner starken Abweichung bei den positiven Proben eine deutlich andere Aussagetendenz auf. Ob diese nun genauer den zytologischen, kolposkopischen und histologischen Ergebnissen entsprechen, lässt sich mit den nachfolgenden Vergleichen klären.

Berechnet man die Sensitivität anhand der HCII-Daten, so kommt der Viroactiv-Test nur auf einen Wert von 24%. Die Spezifität beläuft sich immerhin auf 76% und der negative prädiktive Wert liegt bei 38%.

4.3.2 Viroactiv / HCII, im Vergleich zur Zytologie

Teilt man die Daten der Patientinnen nach den zytologischen Befunden (Pap I-IV) und betrachtet daraufhin die prozentualen Anteile der positiven Virusnachweise, ergeben sich interessante Erkenntnisse.

Bei den zytologisch unauffälligen Abstrichen der Kategorie Pap I und Pap II gibt der Viroactiv-Test eine virale Befallsrate von 24% an. Der HCII-Test dagegen weist nur in 13% der Präparate eine Virusinfektion nach.

Dies bedeutet, dass die in der zytologischen Untersuchung als nicht verdächtig erscheinenden Abstriche durch einen positiven HPV-Befund in den Risikobereich einer entstehenden Dysplasie eingestuft werden. Aus bestehenden „high risk“ (Typ 16 und 18) HPV-Infektionen entwickeln sich jedoch nur etwa 10% zu einer Dysplasie (Koutsky et al., 1992) bzw. 2% zu einem Zervixkarzinom (zur Hausen und Richart 1995). Dieser negative psychologische Aspekt der unnötigen Verunsicherung der untersuchten Frauen sowie der erhöhte Kostenaufwand durch kürzere Folgeuntersuchungsintervalle wird bereits bei den etablierten HPV-DNA-Tests kontrovers diskutiert. Nun fällt bei dem Viroactiv-Test dieser Nachweisbereich um über 10% höher aus als beim gängigen DNA-Nachweis. Dieser Aspekt wirkt sich negativ auf das getestete Verfahren aus.

Bei den folgenden als Pap IIw kategorisierten Patientinnen fällt die laut Viroactiv-Test mit HPV befallene Anzahl der Patientinnen auf 18% zurück. Im HCII-Test sind es 34% mit positivem Virusnachweis.

Die Patientinnen, die bei der Zytologie eine Pap III, also entzündliche Zellen aber noch keine klare Dysplasie aufweisen, erzielen bei beiden Virus-Nachweisen vergleichbare Ergebnisse. Der Viroactiv-Test liegt mit 40% etwas unter dem HCII-Test, der 46% als viruslastig ermittelt.

Bei den Pap IIID-Befunden sinkt der Virusnachweis durch Viroactiv auf nur 28%. Der HCII-Test findet bei 66% der Proben das HP-Virus. Gerade in dieser Kategorie, die auch als CIN 1 (Zervicale Intraepitheliale Neoplasie Grad 1) nach der WHO-Nomenklatur gehandelt wird, vermutet man das höchste Aufkommen der aktiven HPV-Infektionen. Ein Testverfahren, welches hauptsächlich diese Phase der Virusvermehrung detektieren soll, müsste bei dieser Gruppe eigentlich eine weit höhere Nachweisrate erbringen.

Auch die folgenden zwei Kategorien Pap IVa sowie Pap IVb fallen mit jeweils 17% und 29% an positivem HPV-Nachweis durch den Viroactiv-Test sehr gering aus. Der HCII-Test liegt mit 82% und 57% deutlich höher und ist somit aussagekräftiger, auch

wenn bei diesen CIN 2/3 Graden nicht mehr von einem so hohen Aufkommen an aktiven Virus-Infektionen ausgegangen wird.

Somit fällt die errechnete Sensitivität in Bezug auf die Zytologiewerte für den Viroactiv-Test mit nur 27% sehr niedrig aus. Der HCII-Test erreicht in dieser Studie lediglich 57%, und entspricht damit nicht den in der Literatur angegebenen 89% bis 95% (Cuzick et al., 1999; Iftner et al., 2000; Schneider et al., 2000; Clavel et al., 2001), jedoch liegt er doppelt so hoch, wie der zu beurteilende Viroactiv-Test.

Bei der Spezifität liegen die beiden Testverfahren deutlich näher und in einem durchaus akzeptablen Bereich. Der Viroactiv-Test erreicht 78% Spezifität, der HCII-Test 85%. Berechnet man den negativen prädiktiven Wert der zwei Testverfahren, erreicht der HCII-Test mit 80% einen doppelt so hohen Wert wie der Viroactiv-Test mit nur 40%.

4.3.3 Viroactiv/HCII, im Vergleich zur Kolposkopie

Betrachtet man nun die prozentualen Anteile der positiv getesteten Virusnachweise der kolposkopisch untersuchten Patientinnen, erreichen die beiden Testverfahren wiederum sehr unterschiedliche Ergebnisse.

Bei den kolposkopisch untersuchten Frauen, die keinen auffälligen Befund aufweisen, liegen beide positiven Virusnachweise, wie es zu erwarten war, recht niedrig. Der Viroactiv-Test weist bei nur 16% der Patientinnen Virus nach. Der HCII-Test findet bei 21% der Frauen HPV-DNA. Diese Werte sind für beide Tests vertretbar, da kolposkopisch unauffällige Befunde eine HPV-Infektion nicht kategorisch ausschließen.

Diejenigen Frauen, welche einen auffälligen kolposkopischen Befund aufweisen, zeigen in den beiden Tests jedoch sehr unterschiedliche Ergebnisse. Bei den Frauen, die kolposkopisch den Verdacht auf eine CIN (zervikale intraepitheliale Neoplasie) aufweisen, bestimmt der Viroactiv-Test in nur 35% der Proben eine HPV-Befall. Der HCII-Test kommt immerhin auf 62% positiven Virus-DNA-Nachweis. Auch wenn man berücksichtigt, dass die Kolposkopie aufgrund ihrer mäßigen Sensitivität

eine hohe Rate falsch-positiver Befunde (10-30%) aufweist, liegt der HCII-Test mit seinen 62% Virusnachweis eher in dem Bereich der erwarteten Virus-Infektionsrate. Bei den mittels Kolposkopie nachgewiesenen vulvären intraepithelialen Neoplasien (VIN) ist der Unterschied der Ergebnisse der beiden Testverfahren sogar noch gravierender. Der Viroactiv-Test weist in nur 17% der Proben einen Befall mit HPV nach. Der Wahrscheinlichkeit eher entsprechend kommt der HCII-Test auf eine Befallsdichte von 83%.

Diese Daten weisen wiederum die hohe Ungenauigkeit des Viroactiv-Tests auf.

Die Sensitivität des Viroactiv-Tests liegt anhand der kolposkopischen Daten lediglich bei 30%. Der HCII-Test dagegen weist eine Sensitivität von 67% auf. Bei der Spezifität erzielen beide Testverfahren mit 76% (Viroactiv) und 78% (HCII) ähnliche Ergebnisse. Und auch der negative prädiktive Wert ist bei beiden Tests vergleichbar (Viroactiv 76% zu HCII 84%).

4.3.4 Viroactiv/HCII, im Vergleich zur Histologie

Die Ergebnisse des Viroactiv-Tests der histologisch untersuchten Patientinnen weisen keine logisch nachvollziehbaren Gesetzmäßigkeiten dieses Tests auf.

Wiederum liegen die positiven Virusnachweise des Viroactiv-Test in fast allen Kategorien weit unter denen des HCII-Tests. Bei allen drei CIN Graden (1, 2, 3) weist der Viroactiv-Test annähernd nur halb so viele HPV-Infektionen nach wie der HCII-Test (CIN 1 19%:52%; CIN 2 50%:89%; CIN 3 15%:85%). Dabei gibt die Literatur eine prozentuale Befallshäufigkeit der CIN 2/3 mit high-risk-HPV von 85% an (Hillemanns et al., 1997). Der Viroactiv-Test kommt nur auf 29%. Der HCII-Test dagegen liegt mit 86% exakt im angegebenen Bereich.

Die erstaunlicherweise gleich hohe Trefferquote der beiden Virusnachweise bei den histologisch als VIN (vulväre intraepitheliale Neoplasie) befundeten Patientinnen, mit 75% dürfte als Zufallsübereinstimmung eingestuft werden. Dafür spricht auch das völlige Ausbleiben eines positiven Virus-Nachweises durch den Viroactiv-Test bei der Kategorie der VAIN (vaginale intraepitheliale Neoplasie), welche durch den HCII-Test zu 100% als Virus-infiziert nachgewiesen wurden.

Betrachtet man nun die Sensitivität der beiden Test-Verfahren bezogen auf die Histologiedaten, so erreicht der Viroactiv-Test wieder nur 27%. Beim HCII-Test beläuft sich die Sensitivität immerhin auf 77%.

Bei der Spezifität dagegen liegt in diesem Fall der Viroactiv-Test mit 64% etwas über dem HCII-Test, der nur eine Spezifität von 53% aufweist.

Beim negativen prädiktiven Wert liegt der HCII-Test mit 81% über den 66% des Viroactiv-Tests.

4.3.5 Vergleich der Viroactiv/HCII Ergebnisse speziell bei CIN 1 Befunden

Diejenigen Präparate, die zusätzlich zu einer kolposkopischen Untersuchung durch eine Knipsbiopsie auch histologisch untersucht werden und dabei eine Dysplasie aufweisen, gelten zu fast 100% als sicher abgeklärt.

An dieser Stelle sei wiederum erwähnt, dass es sich bei der vorliegenden Kategorien CIN 1 um eine Dysplasie-Stufe handelt, bei der nachgewiesenermaßen eine aktive HPV-Infektion der Hochrisikogruppe vorliegt. Deshalb wurden die Ergebnis-Daten der beiden Virus-Tests in dieser Kategorie nochmals genau verglichen, da der Viroactiv-Test gerade in dieser Kategorie die genauesten Nachweise erbringen müsste. Eine aktive Infektion bedeutet, dass eine Virusproduktion erfolgt, welches wiederum den Nachweis der Virus-Proteine voraussetzt (Viroactiv-Test). Aktive sowie latente Infektionen können nur durch einen HPV-DNA-Test ermittelt werden (HCII-Test).

Die Ergebnisse jedoch sind enttäuschend. Der Viroactiv-Test erlangt nur einen positiven Test-Nachweis von 19%, wohingegen der HCII-Test bei 52% der Patientinnen eine Virus-Infektion nachweist. Hinzu kommt noch, dass bei einem direkten Vergleich der Testergebnisse in nur 52% eine Übereinstimmung über das Vorliegen einer Virus-Infektion herrscht. Von den 21 Proben weist der HCII-Test elf als virushaltig nach. Von diesen elf sind nur drei auch im Viroactiv-Test positiv, der Rest erscheint negativ. Dagegen stellt der Viroactiv-Test eine der zehn negativen HCII-Ergebnisse als positiv dar. Eigentlich würde man zumindest eine größere Übereinstimmung der beiden Testverfahren erwarten. Diese starke Diskrepanz ist bei den vorliegenden Untersuchungsdaten nicht vertretbar.

4.4 Altersverteilung der HPV-Infektionen

Da die HPV-Infektion zu den sexuell übertragenen Krankheiten zählt, ist ein vermehrtes Auftreten einer aktiven Infektion während der sexuell aktiven und reproduktiven Jahre anzunehmen. Hillemanns et al. (1997), gibt für Frauen bis 40 Jahre eine erhöhte Inzidenz neoplastischer Prozesse der Cervix uteri an. Da jedoch über 95% der HPV-Infektionen vollständig und folgenlos eliminiert werden, ist davon auszugehen, dass bei Frauen im fortgeschrittenen Alter weniger, und wenn, die latenten, persistenten Infektionen vorherrschen (Hildesheim 1994, Schneider 2001). Die Literatur gibt im Alter zwischen 20 und 25 Jahren einen Häufigkeitsgipfel der HPV-Infektionen von 30% an. In der Altersstufe von 35 bis 50 Jahren sinkt diese jedoch auf nur noch 3% herab (Pfister 1997, Schneider et al., 2001)

Betrachtet man nun unter diesen Voraussetzungen die Ergebnisse der beiden Virusnachweise, so ist bei dem DNA-Nachweis mittels HCII-Test, den Erwartungen zu Folge, ein eindeutiger Unterschied der beiden Altersgruppen aufzuweisen. Die Infektionsrate bei den unter 40 Jahre alten Frauen liegt mit 44% mehr als doppelt so hoch wie bei den über 40-jährigen, die einen Virusbefall von nur 20% aufweisen.

Vergleichend dazu zeigt der Viroactiv-Test, der sich besonders durch den Nachweis der aktiven Infektion und nicht der persistent latenten Infektion auszeichnen soll, keine Unterschiede in den Infektionsraten der beiden Altersgruppen. Sowohl die unter als auch die über 40 Jahre alten Frauen weisen mit 24% bzw. 25% eine völlig gleich bleibende HPV Infektionsbefallshäufigkeit auf.

Diese Daten belegen recht eindeutig, dass die besondere Qualität des Viroactiv-Tests, nur die aktiven und damit klinisch relevanten Infektionen zu detektieren, nicht zuverlässig ist. Ein Einsatz in der Screening- wie auch der Differentialdiagnostik der Zervixdysplasie ist aufgrund unserer Ergebnisse nicht zu empfehlen.

4.5 Vergleich mit anderen Studien

In einer vergleichbaren Studie führten Melsheimer et al (2003) bei 74 Frauen mit LSIL(= CIN1) bzw. HSIL(= CIN2/3) den gleichen Proteinnachweis wie in dieser Arbeit durch (Viroactiv/Virofem Diagnostik). Sie verglichen die Gruppe der High-risk HPV-Typen 16,18,33,35,39,45,56 und 58 mittels Proteinnachweis mit einem DNA-Nachweis durch PCR bei allen Patientinnen. Zusätzlich wurde nur der HPV-Typ 16 mittels Protein sowie PCR-Nachweis ermittelt.

Anders als in unserem Fall, wo bereits nach Papanicolaou gefärbte, drei Jahre alte Präparate zur Verfügung standen, wurden die Proben per Cytobrush frisch entnommen und mittels Cytozentrifuge komprimiert, bevor über ein ähnliches Verfahren die Färbung durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse dieser Erhebung entsprachen eher den Erwartungen, die diesem Nachweissystem entgegen gebracht werden.

Der high-risk Protein-Nachweis wies bei den LSIL (CIN1) bei immerhin 43,7% ein positives Ergebnis auf, dies ist im Vergleich zu unserer Studie mit nur 19% eine erhebliche Verbesserung.

Die HSIL (CIN2/3) kategorisierten Patientinnen wiesen, wie angenommen, eine niedrigere Anzahl positiver Proteinnachweise auf, welche mit 33% denen unserer Studie entsprechen.

Wie sich dieser gravierende Unterschied der Ergebnisse insbesondere im Bereich der LSIL/CIN1 Patientinnen erklären lässt, bleibt fraglich. Ob sich durch die vorangehende Behandlung der Proben mittels Zentrifuge die Ergebnisse so stark beeinflussen lassen oder doch das Alter der Präparate eine ausschlaggebende Rolle spielt, muss in weiteren Studien abgeklärt werden.

5 Zusammenfassung

In Deutschland nehmen nur ca. 60 % der 25 - bis 40jährigen Frauen regelmäßig an der Krebsvorsorge zur frühzeitigen Entdeckung tumoröser Initialstadien des Zervixkarzinoms teil. Zusätzlich scheint die Zytologie als primäres Screening an ihre Grenzen zu stoßen. Bei einem einmaligen zytologischen Abstrich werden Sensitivitäten von nur 20 - 50 % zum Nachweis von CIN 2/3 und Zervixkarzinom beschrieben (Schneider et al., 2000; Iftner et al., 2000).

Selbst unter optimalen Bedingungen muß beim jährlichen Zervixabstrich in 20 % mit falsch-negativen Ergebnissen gerechnet werden (Soost et al., 1981). Da hochgradig onkogene Papillomviren in der Karzinogenese eine zentrale Rolle spielen und zu 99,7 % bei CIN 2/3 und Zervixkarzinom nachweisbar sind, lassen sich neue Strategien in der Krebsvorsorge erkennen.

Es sind bereits seit längerem HPV-Screening-Tests im Einsatz, von denen jedoch nur drei eine FDA (US-amerikanische Arzneimittelbehörde) - Zulassung bekommen haben. Hierbei handelt es sich um den Hybrid-Capture-Assay (HCII, Digene Diagnostic, USA), sowie zwei Nachweisverfahren mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Zur möglichen Durchführung innerhalb einer gynäkologischen Routineuntersuchung kommt aus Kostengründen nur der HCII-Test in Frage.

In dieser Studie wurde „Viroactiv“, ein neuer HPV-Nachweis der Firma Virofem Diagnostica, Wiesbaden, Deutschland getestet und mit dem HCII-Test verglichen.

Dieser neuartige Test basiert auf monoklonalen Antikörpern, die gegen typenspezifische Bereiche des Kapsidproteins L1 des HPV gerichtet sind. Da dieses Protein ausschließlich während der Replikationsphase gebildet wird, sollen ausschließlich aktive HPV-Infektionen nachgewiesen werden.

Leider wiesen die Ergebnisse dieser Studie keine überzeugenden Argumente für den neuen Virus-Nachweis auf.

So zeigte bereits die Durchführung des Testverfahrens Kritikpunkte durch hohen zeitlichen und personellen Aufwand sowie das Risiko von Ungenauigkeiten. Auch der Vergleich der Ergebnisse mit dem im Vorfeld durchgeführten HCII-Test ergab nur sehr geringe Übereinstimmungen und attestiert dem neuen Nachweisverfahren eine mangelhafte Zuverlässigkeit. Die Sensitivität des Viroactiv belief sich im Durchschnitt

nur auf 28% und ist daher gegenüber dem HCII-Test mit einer Sensitivität von über 90% nicht konkurrenzfähig. Selbst in der Altersgruppe der reproduktiven Frauen bis 40 Jahre, die verhältnismässig häufig unter aktiven HPV-Infektionen leiden, liefert der Test zu viele falsch negative Ergebnisse. Somit erwies sich das Nachweis-Verfahren als unzureichend in seiner Aussagekraft und ist daher nicht geeignet einen verbesserten Einsatz in der Screening- wie auch der Differentialdiagnostik der Zervixdysplasie zu finden.

6 Summary

Protein detection of active HPV-infection A new Analysis in comparison to common DNA-testing

In Germany only about 60% of the 25-40 year old women attend regularly cervical cancer screening for early detection of neoplastic alterations signifying cervical cancer. In addition the routine cytological screening shows a sensitivity of only 20-50% in the detection of CIN 2/3 and cervix carcinoma (Schneider et al., 2000; Iftner et al., 2000). 20% of the annual screenings has turned out to be false negative (Soost et al., 1981).

Persistent infection of the uterine cervix with humane papillomaviruses is an essential precondition for the development of invasive cervical cancer and its precursors. This perception has provided new strategies for cancer screening. There are several HPV-screening tests on the market but only three are accepted by the FDA (Food and Drug Administration). One is the Hybrid Capture Assay (HC II, Digene Diagnostic, USA). The other two base on polymerase chain reactions (PCR) that are highly expensive.

This study has tested a new HPV-screening method called Viroactiv by Virofem Diagnostika, Wiesbaden, Germany in direct comparison to the HC II-test. It is based on monoclonal antibodies that counteract with capsid protein L1 of HPVirus which is only replicated during active infections.

Unfortunately the results of the study revealed no striking arguments for this new method. The realisation of the test already showed critical aspects, implicating a high amount of manpower as well as risk of inaccuracy.

The comparison with the results of the HC II test turned out to be little corresponding. In average the sensitivity of the Viroactiv-test reaches only 28% which is inadequate in comparison with a 90% sensitivity of the HC II-test.

The age group of reproductive women up to 40 years that are expected to have the highest risk of active HPV-Infections showed to high numbers of false negative results.

Summing up, it may be said, that Viroactiv is not suitable for daily routine diagnostic. It is not precise enough to improve screening results and minimize the danger of uterine cervical cancer according to HPV-Infection.

7 Verzeichnisse

7.1 *Literaturverzeichnis*

Abulafia et al., Higher sensitivity for LSIL than HSIL in ThinPrep, *Gynecol Oncol* 90, 137, (2003).

Anderson, GH., Benedet, JL., LeRiche, JC., Maticic, JP., Thompson, JE., Invasive cancer of the cervix in British Columbia: A review of the demography and screening histories of 437 cases seen from 1985 to 1988. *Obstet. Gynecol.*, 80, 1-4 (1992).

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Hrsg.) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut: Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe (2002)

Barron BA, Richart RM: A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on a prospective study of 557 cases. *J Natl Cancer Inst* 1969;41:1343-1353

Barron BA, Richart RM: A statistical model of the natural history of cervical carcinoma. II. Estimates of the transition from dysplasia to carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst* 1970;45:1025.

Bernard, HU., Chan, SY., Manos, MM., Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms, *J. Infect. Dis.*, 170, 1077-1085 (1994).

Böhmer G, van den Brule AJ, Brummer O, Hollwitz B, de Carvalho Gomes H, Meijer CJ et al. No confirmed case of Human Papillomavirus DNA negative Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade III (CIN 3) or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 Patients. *Am.J.Obstet.Gynecol* 2003.

Bosch FX, Munoz N, de SanJose S, Izarugaza I, Gili M, Viladiu P, Tormo MJ, Moreo P, Ascunce N, Gonzales LC, Tafur L, Kaldor JM, Guerrero E, Aristizabal N, Santamaria M, de Ruiz AP, Sahah K.: Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int. J. Cancer*, 52, 750-758 (1992).

Bosch, FX., Manos, MM., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, AM., Peto, J., Schiffman, MH., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K., Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87, 796-802 (1995).

Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., Zur Hausen, H., A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer, *EMBO J.*, 3, 1151-1157, (1984).

Brady, CS, Bartholomew, JS, Burt, DJ, Duggan-Keen, MF, Glenville, S, Telford, N, Little, AM, Davidson, JA, Jimenez, P, Ruiz-Cabello, F, Garrido, F and Stern, PL. (2000) Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* 55:401-411.

Burghard E: *Early Diagnosis of Cervical Cancer*. Stuttgart, Thime, 1973.

Chao A, Becker TM, Jordan SW, Darling R, Gilliland FD, Key CR. Decreasing rates of cervical cancer among American Indians and Hispanics in New Mexico (United States). *Cancer Causes and Control* 1996;7:205-13.

Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato MNP et al. Human Papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br.J.Cancer* 2001;84:1616-23.

Clavel, C., M. Masure, et al. (2000). Human papillomavirus detection by the hybrid capture II assay: a reliable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions. *Diagn Mol Pathol* 9(3): 145-50.

Clavel, C., M. Masure, et al. (2001). Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer* 84(12): 1616-23.

Coppleson, M., Dalrymple, J.C., Atkinson, K.H.,:Colposcopic differentiation of abnormalities arising in the transformation zone. *Obstet Gynaecol. Clin. North. Am.* 20, 83-10 (1993).

Coppleson, M., The origin and nature of premalignant lesions of the cervix uteri. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 8, 539 (1970).

Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins, S. L., (1993) *Grundlagen der allgemeinen Pathologie*. Fischer, Stuttgart;

Cuzick, J., A. Szarewski, et al. (2003). Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* 362(9399): 1871-6.

Cuzick, J., E. Beverley, et al. (1999). HPV testing in primary screening of older women. *Br J Cancer* 81(3): 554-8.

Dudenhausen, J.W., Schneider, HPG., (Hrsg): *Frauenheilkunde und Geburtshilfe*, Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York (1994).

Dürst, M., Dzarlieva-Petrusevska, R.T., Boukamp, P., Fusenig, N.E., Gissmann, L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene*, 1, 125-256 (1987).

Flores, E. R., Allen-Hoffmann, B. L., Lee, D. & Lambert, P. F. (2000). The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 74, 6622-31.

Galloway, D.A., McDougall, J.K., Human papillomaviruses and carcinomas. *Adv. Virus. Res.*, 37, 125-71 (1989).

Gay JD, Donaldson LD, Goellner JR. False-negative results in cervical cytologic studies. *Acta Cytol.* 1985;29:1043-46.

Glöser, S. Zytodiagnostik auf dem Prüfstand. *Deutsches Ärzteblatt* 93(17), 473-474. 1996.

Graham, S., Epidemiology of retinoids and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 73, 1423 (1984).

Griesser, H., Zeck, S. & Rausch-Damovsky, M. (2000). Immunochemical detection of high risk mucosal human papillomavirus infection in routine cervical smears. In German Society for Pathology, 84th congress.

Gross, G. E., Barrasso, R., (1997) Human papillomavirus infection. Ullstein Mosby, Wiesbaden;

Gross, GE., Barrasso, R., Human Papilloma Virus Infection: A clinical Atlas, Berlin / Wiesbaden, Ullstein Mosby GmbH & Co KG (1997).

Gross, GE., Pfister, H., Seidel, ST., Stegner, HE., Genitale Infektionen durch Papillomaviren. Zuckerschwerdt Verlag (1992).

Grubert T., Friese K., (2003) Impfung gegen HPV: Aktueller Stand und neue Perspektiven zur Vakzinierung gegen humanpathogene Papillomviren.

Hildesheim A. et al (1994): Persistence of type-specific humane papillomavirus infection among cytologically normal women. *J. Infect. Dis.* 169:235.

Hilgarth M, Piper B, Sato SH,,: Sinnvoller Einsatz der CO2-Lasertherapie am unteren Genitaltrakt der Frau. *Geburtsh. und Frauenheilkunde*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York 56, 27-34 (1996)

Hillemanns P., Dannecker C., (2002) Diagnostik der Zervikalen Intraepithelialen Neoplasie

Hillemanns P., Thaler C., Kimming R.;; Zervixkarzinom/ Früherkennung, Tumorzentrum München EDV-Manual (1998)

Hillemanns HG., Biopsiemethoden und ihre selektive Anwendung in Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms. Geburtshelkunde Frauenheilkunde 2, 1104-1122 (1969)

Hillemanns P., Ellerbrock, TV., McPhillips, S., Dole, P., Alperstein, S., Johnson, D., Sun, XW., Chiasson, ME., Wright, TC., Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cytologic abnormalities in HIV - seropositive women. AIDS, 14, 1641-1649 (1996).

Hillemanns P., Thaler, C., Kimmig, R., Epidemiologie und Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie-Ist das derzeitige Konzept von Screening und Diagnostik noch aktuell?. Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch., 37,179-190 (1997).

Holzer E, Pickel H: Die Ausdehnung des atypischen Plattenepithels an der Zervix. Arch Geschwulstforsch 1975;45:79.

Hutchinson, ML., Zahniser, DJ., Sherman, ME., Herrero, R., Alfaro, M., Bratti, MC., Hildesheim, K., Lorincz, AT., Greenberg, MD., Morales, J., Schiffman, M., Utility of liquid - based cytology for cervical carcinoma screening. Cancer, 87, 48-55 (1999).

Iftner, T., S. Menton, et al. (2000). HPV DNA testing significantly increases the detection rate for high-grade cervical neoplasia in a low risk screening population in Germany. 18th Int. Papillomavirus Conference, Barcelona, Spain, Thau, S.L.

Iftner,T., Menton, S., Menton, M., Gomes, H., Garbrecht-Buettner, S., Schopp, B., Iftner, A., Lorincz, AT., Böhmer, G., Petry, KU., HPV DNA testing significantly increases the detection rate for high - grade cervical neoplasia in a low risk screening population in Germany. 18th International Papillomavirus Conference, Barcelona, abstract no. 185 (2000).

Irwin, KI., Rosero-Bixby, L., Oberle, MW., et al., Oral contraceptives and cervical cancer risk in Costa Rica: Detection bias or casual assoziation? JAMA, 259, 59-64 (1988).

Jacues, J., NG ABP (Hrsg.): Gynäkozytologie und Krebsvorsorge in der gynäkologischen Praxis. Verlag Hans Huber, Bern Göttingen Toronto Seattle (1993)

Janerich, DT., Hadjimichael, O., Schwartz, PE., Lowell, DM., Meigs, JW., Merino, MU., Flannery, JT., Polenak, AP., The screening histories of women with invasive cervical cancer, Connecticut. Am. J. Public Health, 71, 428-430 (1995).

Johnson, LD., Nickerson, RJ., Easterday, CL., Stuart, RS., Hertig, AT., Epidemiologic evidence for the spectrum of change from dysplasia through carcinoma in situ to invasive cancers. Cancer, 22, 910 (1968)

Josefsson, A. M., Magnusson, P. K., Ylitalo, N., Sorensen, P., Qwarforth-Tubbin, P., Andersen, P. K., Melbye, M., Adami, H. O. & Gyllensten, U. B. (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. Lancet 355, 2189-93.

Josefsson, A. M., P. K. Magnusson, et al. (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. Lancet 355(9222): 2189-93.

Kenneth, F., Trofatter, Jr., MD., PHD., Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. Am. J. med., 102 (5A), 21-27 (1997).

Kinney, W., Sung, HY., Kearney, KA., Miller, M., Sawaya, G., Hiatt, RA., Missed opportunities for cervical cancer screening of HMO members developing invasive cervical cancer (ICC). Gynecol. Oncol., 71, 428-430 (1998).

Kiviat NB, Crichlow CW, Kurman RJ: Reassessment of the morphological continuum of cervical intraepithelial lesions: Does it reflect different stages in the progression to cervical carcinoma? in Munoz N, Bosch F, Shah K, Mehens A (Hrsg): The

Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus. Lyon IARC, 1992,pp59-66.

Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M (2002) p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am.J.Surg.Pathol.* 26: 1389-1399.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M (2001) Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int.J.Cancer* 92: 276-284.

Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M (1999) Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 59: 6132-6136.

Koss LG. Cervical (Pap) Smear. *New Directions. Cancer* 1993;71:1406-12.

Koss LG: Diagnostic cytology and its histopathologic basis. New York, Lippincot, 1992.

Kottmeier, HL., Evolution et traitement des epitheliomes. *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.*; 56, 821-826 (1961).

Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347:1645-51.

Koutsky, LA, Holmes, KK, Crichtlow, CW, Stevens, CE, Paavonen, J, Beckmann, AM, DeRouen, TA, Galloway, DA, Vernon, D and Kiviat, NB. (1992) A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327:1272-1278.

Lai, HC, Sytwu, HK, Sun, CA, Yu, MH, Yu, CP, Liu, HS, Chang, CC and Chu, TY. (2003) Single nucleotide polymorphism at Fas promoter is associated with cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 103:221-225.

Lehn, H., Ernst, TM., Sauer, G., Transcription of episomal papillomavirus DNA in human condylomata acuminata and Buschke-Löwenstein tumors. *J. Gen. Virol.*, 65, 2003-2010 (1984).

Limburg H.: Comparison between cytology and colposcopy in the diagnosis of early cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1958:75:1298.

Lorincz, AT., Reid, R., Jenson, AB., Greenberg, MD., Lancaster, W., Kurman, RJ., Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of the 15 common anogenital types. *Obstet. Gynecol.*, 79, 328-337 (1992).

Macgregor JE, Campbell MK, Mann EMF, Swanson KY. Screening for cervical intraepithelial neoplasia in north east Scotland shows fall in incidence and mortality from invasive cancer with concomitant rise in preinvasive disease. *BMJ* 1994;308:1407-11.

Massad, LS., Cejtin, HE., Abu-Rustum, NR., Presentation and screening history of indigent women with cervical cancer: Implications for prevention. *J Lower Genital Tract Dis.*, 4, 208-211 (2000).

McMurray H R, Nguyen D, Westbrook T F, McCance D J, :Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 82, 15-33 (2001)

Melsheimer P, Kaul S, Dobeck S, Batert G, :Immunocytochemical Detection of HPV High-Risk Type L1 Capsid Protein in LSIL and HSIL as Compared with Detection of HPV L1 DNA. *Acta Cytologica*, 47:124-128 (2003)

Meijer CJ, van den Brule AJ, Snijders PJ, Helmerhorst T, Kenemans P, Walboomers JMM. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer

screening. Volume: 119 Epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. 1992. p. 271-281.

Meisels, A., Fortin, R., Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I Cytological patterns. Acta. Cytol., 20, 505-509 (1976).

Modrow, S., Falke, D., Aufbau der Papillomviren, in Spectrum: Molekulare Virologie. Spectrum, pp 374-390 (1997).

Navratil E.:Frühdiagnose des Uteruskarzinoms. München, Urban & Schwarzenberg, 1955.

Nees, M, van Wijngaarden, E, Bakos, E, Schneider, A and Dürst, M. (1998) Identification of novel molecular markers which correlate with HPV-induced tumor progression. Oncogene 16:2447-2458.

Neumann, G., Kohlhoff, M., (2001) Neues Testsystem zum Nachweis und Typisierung von aktiven HPV-Infektionen. Gyn 6, 294-300

Nobbenhuis, M. A., J. M. Walboomers, et al. (1999). Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. Lancet 354(9172): 20-5.

Paterok, EM., Siebzehnrübl, E., Meyer, M., Altersspezifische und alterskorrigierte Mortalität gynäkologischer Karzinome - einschl. Mamma-Karzinom. Geburtshilfe u. Frauenheilkunde, 55, 177-181 (1995).

Petry, K. U., S. Menton, et al. (2003). Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. Br J Cancer 88(10): 1570-7.

Pfister H, Papillomavirus: in Darai G, Handermann M, Hinz E, Sonntag G-H (Hrsg) (1997): Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Pfleiderer A, Kaiser R, (Hrsg.): Lehrbuch der Gynäkologie; 16.Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York (1989)

Pisani, P., Parkin, DM., Ferlay, J.: Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int. J. Cancer* , 55, 891-903 (1993).

Plaxe, SC., Saltzsein, SL., Estimation of the duration of the preclinical phase of cervical adenocarcinoma suggests that there is ample opportunity for screening. *Gynecol. Oncol.*, 75, 55-61 (1999).

Poignee, M, Backsch, C, Beer, K, Jansen, L, Wagenbach, N, Stanbridge, EJ, Kirchmayr, R, Schneider, A and Durst, M. (2001) Evidence for a putative senescence gene locus within the chromosomal region 10p14-p15. *Cancer Res* 61:7118-7121.

Ratnam, S., E. L. Franco, et al. (2000). Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9(9): 945-51.

Rawls, WE., Tomkins, WAF., Figeroa, ME., Melnick, JI., Herpes simplex virus type 2: Association with carcinoma of the cervix. *Science*, 161, 1255-1256 (1968).

Reid, R., Lorincz, AT., Human papillomavirus tests. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 9, 65-103 (1995).

Reid, R., Scalzi, P., Genital warts and genital cancer.VII. An improved colposcopic index for differentiating benign papillomaviral infections from high - grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 153, 611 (1985).

Richart, R.M., Barron, B.A., A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 105,:386-393 (1969).

Rigoni-Stern, D., Fatti statistici relativi alle malattie cancrose. *Giornale Servive Progr. Pathol. Terap. Ser.*, 2, 507-517 (1842).

Romney, SL., Palan, PR., Dattagupta, C., Wasertheil-Smoller, S., Wylie, J., Miller, G., Slagle, NS., Lucido, D., Retinoids and the prevention of cervical dysplasias. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141, 890-894 (1981).

Rotkin, ID., A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res.*, 33, 1353-1367; (1973).

Sapp, M., Kraus, U., Volpers, C., Snijders, P. J., Walboomers, J. M. & Streeck, R. E. (1994). Analysis of type-restricted and cross-reactive epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 and in infected tissues using monoclonal antibodies to the major capsid protein. *J Gen Virol* 75, 3375-83.

Sawaya, GF., Grimes, DA., New technologies in cervical cancer screening: A word of caution. *Obstet. Gynecol.*, 94, 307-310 (1999).

Schiffman, MH., Bauer, HM., Hoover, RN., et al., Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85, 958 (1993).

Schiffman, MH., Kiviat, NB., Burk, RD., Shah, KV., Daniel, RW., Lewis, R., Kuypers, J., Manos, MM., Scott, DR., Sherman, ME., et al., Accuracy and interlaboratory reliability of human papillomavirus DNA testing by hybrid capture. *J. Clin. Microbiol.* 33, 545 –550 (1995).

Schneider A, Hoyer H, Dürst M (2001): Bedeutung des Nachweises von humanen Papillomviren (HPV) für die Vorsorge. *Deutsches Ärzteblatt*.

Schneider V (2001): Zervixabstriche noch zeitgemäß? *Frauenheilkunde plus* 4:30.

Schneider, A., H. Hoyer, et al. (2000). Screening for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer* 89(6): 529-534.

Schneider, A., Hoyer, H., Lotz, B., Leistritz, S., Kühne-Heid, R., Nindl, I., Müller, B., Haerting, J., Dürst, M., Screening for CIN 2/III and cancer by testing for high risk HPV and routine cytology and colposcopy. *Int. J. Cancer*, 89, 529-534 (2000).

Schneider, A., Meinhardt, G., de Villiers, EM., Gissmann L., Sensitivity of cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diagn. Cytopathol.*, 3, 250-255 (1987).

Solinas-Toldo, S, Dürst, M and Lichter, P. (1997) Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus- transfected cells during progression toward immortality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3854-3859.

Solomon, D., Schiffmann, M., Tarone, R., (2001) Comparison of the three management strategies for patients with a typical squamous cell of undetermined significance: Baseline results from a randomised trail. *J Nat Cancer Inst* 93 293-299

Soost H-J, Lange H-J, Lehmacher W, Ruffing-Kullmann B, : The vaiation of cervical cytology-senitivity, specificity and predictive value. *Acta cytol* 35, 8-14 (1991)

Soost, HJ., Baur, S.: Histologie des Plattenepithelkarzinoms der Cervix uteri und seiner Vorstadien; in Soost, HJ. (Hrsg.): Gynäkologische Zytodiagnostik. Stuttgart, Thieme, pp. 209 - 216 (1990).

Soost, HJ., Baur, S.: Materialgewinnung, Fixierung und Versand; in Soost, HJ. (Hrsg.): Gynäkologische Zytodiagnostik. Stuttgart, Thieme, pp. 276-290 (1990).

Soost, HJ., Bockmühl, B., Zock, H., Results of cytologic mass screening in the Federal Republic of Gemany. *The international Academy of Cytology* (1981).

Spitzer, M., Cervical screening adjuncts: recent advances. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 179 (2), 544-56 (1998).

Storey, A, Thomas, M, Kalita, A, Harwood, C, Gardiol, D, Mantovani, F, Breuers, J, Leigh, IM, Matlashewski, G and Banks, L. (1998) Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393 :229-234.

Streeck, R. E., Hilfrich, R., (2000) Papillomavirus-Infektionen, Latente, subklinische oder virulente Erkrankung? Neues Nachweisverfahren erlaubt eine Unterscheidung. Mta Spektrum 15, 233-236

Sun, XW., et al., Human Papillomavirus infection in women infected with the Human Immunodeficiency Virus. N. Engl. J. med., 337, 1343-9 (1997).

Syverton, JT., Berry, GP., Carcinoma in the cottontail rabbit following spontaneous virus papilloma (Shope). Proc. Soc. Exp. Biol.Med., 33, 399-400 (1935).

van der Graaf Y, Voois GP, Gaillard HJL. Screening errors in cervical cytology screening. Acta Cytol. 1987;31:434-38.

Villiers, EM., de, Implication of papillomaviruses in non - genital tumours. in De Palo G., Rilke F., Zur Hausen, H., Herpes and papillomaviruses: Their role in the carcinogenesis of the lower genital tract, Vol. II , Raven Press Verlag, New York; 65-70 (1988).

Vonka, V., Kaňka, J., Hirsch, I., Zavadová, H., Krcmár, M., Suchánková, A., Rezáčová, D., Broucek, J., Press, M., Domorázková, E., Svoboda, B., Havránková, A., Jelinek, J., Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes-simplex-type-2 virus. Int. J. Cancer, 33, 49-60 (1984).

Wagner, C., (1999) Molekulare Onkologie. 2. Aufl., Thime, Stuttgart;

Wagner, D., Die Papillomvirusinfektion der Cervix uteri. Häufigkeit und klinische Bedeutung, Gynäkologie, 2, 174-180 (1989).

Walboomers JMM, de Roda Husman AM, Snijders PJ, Stel HV, Risse EKJ, Helmerhorst T et al. Human papillomavirus in false negative archival cervical smears: implications for screening for cervical cancer. J.Clin.Pathol. 1995;48:728-32.

Wallin KL, Wiklund F, Angström T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G et al. Type-specific persistence of human papillomavirus dna before the development of invasive cervical cancer. N.Engl.J.Med. 1999;341:1633-38.

Weissenbacher, E.R., Schneider, A., Gissmann, L., Gross, G., Heinrich, J., Hillemanns, P., Link, M., Petry, U., Schneede, p., Schneider, V., Spitzbart, H., (2001) Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie de HPV-Infektion des weiblichen Genitale. Medifac-Verlag ,München

Wright, TC., Sun, XW., Anogenital papilloma infection and neoplasia in immunodeficient women. *Obstet. Gynecol. Clin. North. AM.*, 23, 861-95 (1996).

Ylitalo, N., Sorensen, P., Josefsson, A. M., Magnusson, P. K., Andersen, P. K., Ponten, J., Adami, H. O., Gyllensten, U. B. & Melbye, M. (2000). Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 355, 2194-8

Zehbe, I, Voglino, G, Wilander, E, Delius, H, Marongiu, A, Edler, L, Klimek, F, Andersson, S and Tommasino, M. (2001) p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res* 61:608-611.

Ziegenbalg K. : Konisation (Eine retrospektive Analyse am Heinrich-Braun-Krankenhaus Zwickau). Diss. Universität Leipzig (1998)

zur Hausen, H and Richart, RM. (1995) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses 64.

Zur Hausen, H, Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer res.*, 36, 794 (1976).

7.2 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1	Schematische Organisation (linearisiert) des Genoms des Humanen Papillomvirus Typ 16	3
Abbildung 2	Infektionszyklus des humanpathogenen Papillomvirus	4
Abbildung 3	Anatomie der Zervix uteri	12
Abbildung 4	Lokalisation der Zylinder-Plattenepithelgrenze in Abhängigkeit vom Lebensalter	13
Abbildung 5	Das histologische Schema der zervikalen Neoplasien	16
Abbildung 6	Mittlere Progressionszeiten der Dysplasie bis zum invasiven Zervixkarzinom	17
Abbildung 7	Schematische Darstellung von Zelltypen in zytologischen Abstrichen	23
Abbildung 8/9	Immunzytologischer Nachweis von HPV in 400facher Vergrößerung	36
Abbildung 10	Abstrichentnahme von der Portiooberfläche und Abstrichentnahme aus dem Zervikalkanal. Ausstreichen auf dem Objektträger.	40
Abbildung 11	Altersverteilung des Patientinnenkollektivs der Studie	46

Abbildung 12	Veränderung der zervikalen Zellen (Pap 0-IV) in der zytologischen Untersuchung der vorliegenden Proben (n=249) absolut und prozentual	47
Abbildung 13	Prozentuale Verteilung der Befunde nach zytologischer (n=249) und kolposkopischer Untersuchung der zytologisch auffälligen Proben	48
Abbildung 14	Veränderung der zervikalen Zellen in der histologischen Untersuchung der kolposkopisch verdächtigen vorliegenden Proben (n=100) absolut und prozentual	49
Abbildung 15	Prozentual positive Befunde des Viroactiv- bzw. HCII-Tests in den zytologisch vorliegenden Kategorien (Pap I-IV, n=249)	53
Abbildung 16	Prozentual positive Befunde des Viroactiv- bzw. HCII-Tests in den kolposkopisch vorliegenden Kategorien (CIN und VIN, n=155).	54
Abbildung 17	Prozentual positive Befunde des Viroactiv- bzw. HCII-Tests in den histologisch vorliegenden Kategorien (CIN 1-3, VIN, VAIN, n=100)	56
Abbildung 18	Vergleich der positiven Testergebnisse des Viroactiv-/ HCII-Tests in Abhängigkeit des Patientinnenalters in Prozent	58

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Hautläsionen und Tumorerkrankungen und die HPV-Typen, die sie bevorzugt verursachen	8/9
Tabelle 2	Nomenklaturen der CIN	14
Tabelle 3	Münchener Nomenklatur II für gynäkologische Zytodiagnostik	15
Tabelle 4	Spontaner Verlauf (%) der Zervixdysplasie ohne Therapie	17
Tabelle 5	Kolposkopie-Nomenklatur (europäische Terminologie)	27
Tabelle 6	Übersicht über die Hybridisierungsverfahren	32
Tabelle 7	Exemplarische Kontingenztafel zur Berechnung der Spezifität, Sensitivität, sowie negativem und positivem prädiktiven Wert	45
Tabelle 8	Ergebnis des HCII-Tests aller vorliegenden Proben (n=249) absolut und prozentual	50
Tabelle 9	Ergebnis des Viroactiv-Tests aller vorliegenden Proben (n=249) absolut und prozentual	50

Tabelle 10	Vergleich der Ergebnisse des Viroactiv-Tests und des HCII-Tests absolut und prozentual	52
Tabelle 11	Vergleich der Testergebnisse des Viroactiv- bzw HCII-Tests bei allen CIN1 Patientinnen	56
Tabelle 12	Sensitivität, Spezifität und negativer prädiktiver Wert des Viroactiv- bzw. HCII-Tests in Bezug auf die Befunde der Zytologie, Histologie und Kolposkopie	57

7.4 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Ca	Karzinom
Ca.	Circa
CD4	Cluster of Differentiation
CIN 1/2/3	Zervikale Intraepitheliale Neoplasie
d.h.	das heisst
DNA/DNS	Deoxyribonukleinsäure
E	Early
E-B-Virus	Epstein-Barr-Virus
EGF	Epidermal Growth Factor
Fa.	Firma

FDA	US-amerikanische Arzneimittelbehörde
FN	False negative
FP	False positive
Griech.	Griechisch
HCII	Hybrid-Capture-Typ II
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
HLA	Humanes Lymphozytenantigen
HPV	Humanes Papillomavirus
HR-HPV	High Risk- HPV
HSIL	High Squamous Intraepithelial Lesion
Kb	Kilobasen
KD	KiloDalton
L	Late
Lat.	Lateinisch

LSIL	Low Squamous Intraepithelial Lesion
Mod.	Modifiziert
o.g.	oben genannt
Pap	Papanicolaou
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Plated Derivated Growth Factor
POD	Peroxidase
Rb	Retroblasmogen
RNA	Ribonucleinsäure
SIL	Squamous Intraepithelial Lesion
Tab.	Tabelle
TN	True negative
TP	True positive
u.a.	unter anderem

UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VAIN	Vaginale Intraepitheliale Neoplasie
VIN	Vulväre Intraepitheliale Neoplasie
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Heermann Henrik
Geburtsdatum	10. Februar 1974
Geburtsort	Essen
Anschrift	Oberwaldstr. 6 32339 Isenstedt Telefon: 05743/932279

Schulbildung	1980 - 1985 Stifts-Grundschule Essen 1985 - 1994 Grashofgymnasium Essen
--------------	--

Zivildienst	08/1994 – 10/1995 Schwerstbehindertenbetreuung ASB Essen
-------------	---

Studium	11/1995 - 04/2002 Studium der Veterinärmedizin an der LMU München
---------	--

Promotion	Seit 2002 an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München, Klinikum Großhadern
-----------	---

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schmahl für die Überlassung des Themas sowie die besondere Betreuung und Unterstützung.

Herrn Privatdozenten Dr. Peter Hillemanns danke ich vielmals für die gute Zusammenarbeit die unermüdlichen Hilfestellungen und die viele Geduld die er aufgebracht hat, bis diese Dissertation endlich vollendet war.

Für die mühsame Arbeit der Zweitbewertung der Proben möchte ich Dr. Marija Hillemanns meinen herzlichen Dank aussprechen.

Dem Team des onkologischen, sowie des zytologischen Labors des Klinikum Großhadern danke ich für die gute Zusammenarbeit; besonders Frau Fileki und Frau Braken, die mir beide eine große Hilfe waren und mich freundlich aufgenommen haben.

Besonderer Dank geht an meine liebe Frau Pina, ohne die ich diese Arbeit nie bewältigt hätte und auch an Johannes und Julian, die mir zumindest ab und zu Ruhe gegönnt haben, um mich zu konzentrieren.

Für den täglichen Beistand, die viele Kraft, das Babysitten und ihre Liebe danke ich meinen Eltern.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Stephan für die Unterstützung bei der Erstellung der Statistik danken.