

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter

**Untersuchung der Sanierbarkeit von humanen Papillomvirus (HPV)-
assoziierten Genitaleffloreszenzen durch Nd:YAG-Lasertherapie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Fabian Ziller
aus München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. J. Eberle
Prof. Dr. P. Kaudewitz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. P. Schneede

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2003

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 1
2	Material und Methoden 7
2.1	<u>Ethikvotum</u> 7
2.2	<u>Rekrutierung der Patienten</u> 7
2.3	<u>Retrospektive, aktengestützte Datenerhebung</u> 8
2.3.1	Patientenmerkmale eingeschlossener Fälle 8
2.3.2	Klinische Untersuchung 9
2.3.3	Laserbehandlung 10
2.3.4	Routine-Kontrolluntersuchungen 11
2.3.5	Partneruntersuchung 11
2.4	<u>Studiendesign der prospektiven Untersuchungen</u> 12
2.4.1	Zeitpunkt der Nachuntersuchung 12
2.4.2	Klinische Untersuchung 12
2.4.3	Probengewinnung 12
2.4.4	HPV-Laboranalyse 14
2.5	<u>Datenanalyse und statistische Methoden</u> 22
3	Ergebnisse 24
3.1	<u>Ergebnisse der retrospektiven, aktengestützten Datenerhebung</u> 24
3.2	<u>Ergebnisse der prospektiven Untersuchungen</u> 28
3.2.1	Klinischer Untersuchungsbefund 28
3.2.2	HPV-Laborergebnisse 31
3.2.3	Zusammenfassung klinischer und labortechnischer Parameter 34
4	Diskussion 36
5	Zusammenfassung 49
6	Literaturverzeichnis 51
7	Abkürzungen 59
8	Danksagung 61
9	Lebenslauf 62
10	Anhang 63

1 Einleitung

Warzen werden in der Literatur schon seit langer Zeit erwähnt. Celsus beschreibt in seinem Werk „De Re Medica“ im ersten Jahrhundert unserer Zeitrechnung drei Warzentypen, die er Acrochordon, Thymion und Myrmecia nennt und die heute den Verrucae vulgares, Genitalwarzen und Plantarwarzen entsprechen. Schon die Römer waren der Überzeugung, daß Genitalwarzen sexuell übertragen werden. Lange Zeit wurden Genitalwarzen als Begleiterscheinung klassischer venerischer Erkrankungen wie Syphilis oder Gonorrhoe angesehen. 1907 postulierte Cuiffo die virale Genese von Warzen, nachdem es ihm gelang, mittels zellfreier Filtrate von Warzenaufschwemmungen Warzen zu übertragen [25]. Strauss und Mitarbeitern gelang es 1950 erstmals, Papillomviren in Warzengewebe mittels Elektronenmikroskopie darzustellen [83]. Da es nicht möglich ist, Papillomviren in Gewebekulturen anzuzüchten, gestaltete sich die weitere Charakterisierung der Papillomviren lange Zeit schwierig. Ursprünglich wurde angenommen, daß die verschiedenen Warzenformen beim Menschen nur durch ein einziges Papillomvirus hervorgerufen würden. Erst mit dem Einsatz von DNA-Hybridisierungstechniken gelang es zur Hausen und Mitarbeitern Mitte der 1970er Jahre zu belegen, daß es mehr als nur ein humanes Papillomvirus (HPV) gibt [31, 93].

Besondere Aufmerksamkeit haben HPV erlangt, seitdem in den 1980er Jahren zunehmend der Zusammenhang einiger HPV-Subtypen mit Präkanzerosen und Karzinomen der Haut und Schleimhäute bekannt wurde. Aufgrund umfangreichen epidemiologischen sowie virologischen Datenmaterials gilt heute der Kausalzusammenhang zwischen HPV und dem zweithäufigsten Malignom der Frau, dem Zervixkarzinom, als bewiesen [12, 88]. Diesem Sachverhalt wurde auch von Seiten der WHO Rechnung getragen, die die HPV-Typen 16 und 18 offiziell als Karzinogene und die Typen 31, 33, und 35 als wahrscheinliche Karzinogene eingestuft hat [90]. Darüber hinaus werden der Gruppe der so genannten High-risk-HPV-Typen in der Literatur weitere HPV-

Typen zugeschrieben, die offensichtlich zu malignen Entartungen führen können.

HPV-Typen, die überwiegend in gutartigen Epithelveränderungen nachgewiesen werden und keine Assoziation zu Präkanzerosen und Karzinomen haben, werden als Low-risk-HPV-Typen angesehen. Als häufigste Vertreter dieser Gruppe sind die Typen 6 und 11 zu nennen, die für mehr als 90 % aller Kondylome verantwortlich sein sollen [61].

Bislang sind über 80 verschiedene Genotypen aus der Familie der humanen Papillomviren bekannt, von denen mehr als 30 Typen zu Infektionen im Genitoanalbereich führen [71].

Bekanntlich handelt es sich um kleine, doppelsträngige DNA-Viren, die von einer Proteinhülle, dem Kapsid, umschlossen sind [61]. Phylogenetische Studien belegen, daß es sich um ein sehr altes Virus handelt, welches sich in der Evolution seit Jahrtausenden frühzeitig auf den Menschen spezialisiert hat [85].

Neben hoher Wirtsspezifität zeigen HPV einen ausgesprochenen Epitheltropismus, d.h. sie vermehren sich ausschließlich in Plattenepithelzellen von Haut und Schleimhaut. Hierbei haben die einzelnen Subtypen offenbar unterschiedliche Affinitäten zu den Zellen verschiedener Körperregionen. So können HPV-Typen, die vornehmlich in Warzen der äußeren Haut gefunden werden, von solchen unterschieden werden, die hauptsächlich im Anogenitalbereich, in der Mundhöhle oder im oberen Respirationstrakt vorkommen, und deshalb als mukosaassoziierte HPV-Genotypen bezeichnet werden [35].

Die Manifestationsformen von HPV-Infektionen im Genitoanalbereich lassen sich in drei Gruppen einteilen: klinische, subklinische und latente HPV-Infektionen. Klinische Infektionen können aufgrund ihres typischen Erscheinungsbildes ohne weitere Hilfsmittel problemlos erkannt werden. Hierzu zählen neben den bekanntesten HPV-Läsionen, den Condylomata acuminata, auch die Buschke-Löwenstein-Tumoren, Condylomata plana, papulöse Effloreszenzen und flachkondylomatöse Effloreszenzen sowie die bowenoide

Papulose. Subklinische HPV-Infektionen lassen sich nur durch Markierungstechniken, wie z.B. dem Essigsäuretest, und anschließende optische Vergrößerungstechniken (Lupe, Kolposkop) sowie mikroskopisch nachweisen. Die latenten Infektionen sind weder klinisch, histologisch oder zytologisch darstellbar, sondern allein durch labortechnischen HPV-DNA-Nachweis zu diagnostizieren, da morphologische Zellveränderungen fehlen [32].

Epidemiologische Daten über Inzidenz und Prävalenz von HPV-Infektionen sind nur schwer zu erheben. Zum einen liegt das daran, daß die meisten Infektionen subklinischer und latenter Art sind und somit der klinischen Diagnose entgehen. Zum anderen können HPV auch heute nicht kulturell angezüchtet werden, und verlässliche HPV-DNA-Nachweismethoden wurden erst in der jüngsten Vergangenheit entwickelt. Nicht zuletzt sind HPV-Infektionen nicht meldepflichtig, so daß zentrale epidemiologische Register fehlen.

In den letzten 30 Jahren hat die Inzidenz genitoanaler HPV-Infektionen drastisch zugenommen [4, 22]. Epidemiologische Studien weisen durch sensitive Laborverfahren humane Papillomviren heute als die weltweit häufigsten sexuell übertragbaren Virusinfektionserreger aus [74]. Epidemiologische Daten besagen, daß in den USA ca. 1 % der sexuell aktiven Erwachsenen zwischen dem 15. bis 49. Lebensjahr Warzen im Genitoanalbereich haben. Subklinische HPV-Infektionen lassen sich bei ca. 4 % der sexuell aktiven Personen nachweisen, und ca. 10 % der Geschlechtsaktiven sollen latent mit HPV infiziert sein. Der Anteil an HPV-Antikörper-positiven Personen wird auf 60 % der Bevölkerung geschätzt. Das Risiko, im Leben eine HPV-Infektion durchzumachen, wird daher mit nahezu 80 % beziffert [45].

Anogenitale Infektionen mit humanen Papillomviren erfolgen zum überwiegenden Teil während des Geschlechtsakts durch Mikroverletzungen, durch die die Viren in die epitheliale Basalzellschicht gelangen. Während des Geburtsvorgangs sollen entsprechend auch Viren von der HPV-infizierten Mutter auf das Kind übertragen werden können. HPV-DNA konnte auch auf kontaminierten Gegenständen nachgewiesen werden. Ob HPV auf unbelebten Vektoren allerdings effektiv infektiös bleiben, ist derzeit noch ungeklärt [30].

Die Inkubationszeit genitoanaler Warzen variiert zwischen 3 Wochen bis zu 8 Monaten, wobei die meisten Warzen innerhalb von 2-3 Monaten auftreten [60]. Jedoch ist ein Auftreten von Warzen auch noch nach einer Latenz von Jahren möglich.

HPV-Infektionen des äußeren Genitale verlaufen in der Regel asymptomatisch. Vereinzelt wird von Patienten über Juckreiz, Schmerzen oder Blutungen berichtet [36]. Externe genitoanale Kondylome können auch mit HPV-Läsionen angrenzender Körperöffnungen (Urethra, Vagina/Zervix, Analkanal) vergesellschaftet sein. Begleitsymptome finden sich in diesen Fällen häufiger [72].

Für die Sanierung klinischer und subklinischer HPV-Effloreszenzen stehen zahlreiche konservative und operative Therapieoptionen zur Verfügung. An konservativen Möglichkeiten gibt es antimittotische (Podophyllotoxin, 5-Fluorouracil), kaustische (Trichloressigsäure) und immuntherapeutische (Imiquimod, Interferon- β) Agentien. Chirurgische Verfahren beinhalten Exzision, Kryotherapie, Elektrokoagulation und Lasertherapie (CO₂-Laser, Nd:YAG-Laser). Während einige Methoden nicht einmal zu einer vollständigen Beseitigung der Genitalläsionen führen, kommt es bei anderen Verfahren nach primär erfolgreicher Lokalsanierung unterschiedlich häufig zu Rezidiven [8, 37, 56].

Sowohl eine exakte Bewertung der Effektivität der einzelnen Therapieformen als auch evidenzbasierte Studien zwischen unterschiedlichen Behandlungsformen sind schwierig, da die Sanierungs- und Rezidivraten der Verfahren weitgehend nicht in kontrollierten, prospektiven, randomisierten Studien evaluiert worden sind.

Die Laserbehandlung von HPV-Effloreszenzen im Genitoanalbereich ist allgemein anerkannt [34, 57, 71, 86, 89]. Sowohl der CO₂-Laser als auch der Nd:YAG-Laser, die unterschiedliche Wechselwirkungen mit bestrahlten Geweben aufweisen, kommen hier zum Einsatz. Der CO₂-Laser ist dabei durch eine oberflächliche Absorption der Laserenergie charakterisiert, wodurch es bei einer Tiefenwirkung <1 mm zur Karbonisierung und Vaporisierung des Gewebes

kommt. Die Wirkung des Nd:YAG-Lasers beruht hingegen auf einer Volumenabsorption, bei der die Koagulation des Gewebes mit einer Tiefenwirkung bis zu 8 mm im Vordergrund steht, ohne daß die Gewebestruktur durch Vaporisation zerstört wird [41]. Entsprechend ist eine histologische Begutachtung des mit dem Nd:YAG-Laser bestrahlten Gewebes noch möglich.

Studien über die Sanierung von HPV-Effloreszenzen mit dem Nd:YAG-Laser wurden bisher im Vergleich zum CO₂-Laser wesentlich seltener durchgeführt. Dies liegt hauptsächlich daran, daß der bereits früher entwickelte CO₂-Laser schon lange in der Gynäkologie und Dermatologie zur Behandlung von Haut- und Schleimhautläsionen zum Einsatz kommt. Der Nd:YAG-Laser wurde hingegen erst später entwickelt und wird hauptsächlich in der Urologie verwendet aufgrund seiner Einsetzbarkeit auch in Harnröhre und Harnblase, was mit dem CO₂-Laser nicht möglich ist [41].

Berichte über den Sanierungserfolg der Lasertherapie von genitoanal HPV-Effloreszenzen sind zum Teil sehr widersprüchlich. So werden Heilungsraten zwischen 100 % [5, 15, 26] und 27 % [52] sowie Rezidivraten zwischen 0 % [5] und 66 % [17] angegeben.

Sowohl Sanierungserfolg als auch Rezidivraten in den jeweiligen Studien werden stark von einer Reihe von Faktoren beeinflusst, die in den Studien zum Teil sehr divergieren: Nachbeobachtungszeitraum, Lokalisation und Ausdehnung der Kondylome, Bewertung von subklinischen Effloreszenzen und Definition eines Rezidivs.

So variieren die durchgeführten Nachbeobachtungszeiträume in verschiedenen Studien von 2 Wochen [52] bis zu 34 Monaten [50].

Die Ausdehnung und Lokalisation der Effloreszenzen ist teilweise sehr uneinheitlich, so daß bei einigen Studien eine einmalige Laserung zur Sanierung ausreichte [26, 79], bei anderen zum Teil mehrere Behandlungen erforderlich waren [5, 69].

Auch bei der Erfassung der verschiedenen HPV-Effloreszenzen zeigen sich große Unterschiede. Einige Studien berücksichtigen ausschließlich mit dem bloßen Auge sichtbare klinische Effloreszenzen [26, 52], andere behandeln auch subklinische Läsionen, jedoch nur selektiv [29], weitere beschäftigen sich

nur mit subklinischen Läsionen [17], und andere Studien behandeln und evaluieren beide Effloreszenzformen im Patientengut [69, 70].

Letztendlich ist auch die Begriffsdefinition eines Rezidivs uneinheitlich.

Beispielsweise definiert eine Studie eine Entstehung von neuen Läsionen erst nach einer neunmonatigen erscheinungsfreien Phase als ein Rezidiv [27],

während eine andere Publikation ein Wiederauftreten bereits zwei Wochen nach Laserung als frühe Rezidive bezeichnet [29].

Verlaufsbeobachtungen von genitoanal HPV-Effloreszenzen nach Lasertherapie wurden bisher einzig unter klinischen und histopathologischen Gesichtspunkten durchgeführt. Lediglich eine Studie beschäftigte sich mit Virus-DNA-Analysen nach CO₂-Lasertherapie. Hierbei wurden jedoch nur klinische HPV-Rezidive auf HPV-DNA hin untersucht, unauffällige Laserareale jedoch nicht [53].

Fragestellung

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, bei aussagekräftigem Kontrollintervall nach Nd:YAG-Lasertherapie von HPV-Läsionen des Genitale, die klinische HPV-Sanierung sowie erstmalig auch die labortechnische HPV-Clearance in Laserarealen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Entsprechend der klinischen Fragestellung wurde ein Ethikantrag vor Studienbeginn bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München gestellt. Unter dem Titel „Untersuchungen von Expositionsrisiken und Sanierbarkeit der Infektionen mit humanen Papillomviren (HPV) im urologischen Fachgebiet“, Projekt Nr. 92/99, erhielt die geplante Studie ein positives Votum. Alle Patienten wurden, wie von der Ethikkommission gefordert, mündlich als auch mittels eines Patientenmerkblattes ausführlich aufgeklärt und unterzeichneten vor freiwilliger Studienteilnahme eine entsprechende Einwilligung. Kopien des Ethikvotums, des Patientenmerkblattes und der Einverständniserklärung finden sich im Anhang.

2.2 Rekrutierung der Patienten

In der Zeit von 1988 bis 1998 wurden in der Klinik für Urologie 179 für unsere Studienzwecke geeignete Patienten aufgrund von klinischen und/oder subklinischen HPV-Läsionen des äußeren Genitale mit dem Nd:YAG-Laser behandelt. Von diesen Patienten konnten 119 angeschrieben und zu einer freiwilligen Kontrolluntersuchung aufgefordert werden. 60 Patienten waren unbekannt verzogen oder anderweitig nicht mehr erreichbar. Von den erreichten Patienten stellten sich 104 Männer Ende 1998 zur Nachuntersuchung in der Klinik vor, wovon 103 Männer in die Studie eingeschlossen werden konnten.

2.3 Retrospektive, aktengestützte Datenerhebung (1988-1998)

2.3.1 Patientenmerkmale eingeschlossener Fälle

Das Alter der 103 Männer lag zum Zeitpunkt der Behandlung zwischen 19 und 71 Jahren (Median 29 Jahre). Tabelle 1 gibt die entsprechende Altersverteilung wieder.

Tab. 1 : Altersverteilung der 103 Männer bei initialer Lasertherapie

Alter [Jahre]	Patienten [Anzahl]
19-25	36
26-30	30
31-35	20
36-45	4
46-55	10
> 55	3

47 der 103 Männer stellten sich in der urologischen HPV-Spezialsprechstunde zur Partneruntersuchung aufgrund gynäkologisch festgestellter HPV-Infektion der Partnerin vor. 51 Männer wurden aufgrund vorab ärztlich festgestellter Kondylome in der Sprechstunde vorstellig, wovon 29 Patienten von einem Urologen, 11 von einem Dermatologen und 11 vom Hausarzt überwiesen wurden. Die restlichen 5 Männer suchten aus eigenem Antrieb die Sprechstunde auf, da sie verdächtige Hautläsionen des Genitale selbst bemerkt hatten. Sämtliche in die Studie eingeschlossenen Männer waren heterosexuell. 38 von 103 (36,9 %) Männern waren bereits vor der Lasertherapie in der urologischen Klinik teils mehrfach erfolglos mit unterschiedlichen Methoden extern vorbehandelt worden, was anamnestisch erfragt wurde. Tabelle 2 zeigt die einzelnen durchgeführten Vorbehandlungen.

Tab. 2: Art und Anzahl an Vorbehandlungen bei 38/103 Männern

Durchgeführte Behandlungsmethoden bei 38 Patienten	Patienten (n =)	Anwendungshäufigkeit		
		1 mal	2 mal	3 mal
A) Medikamentöse Therapien				
Podophyllin (20 %)	15	11	3	1
Podophyllotoxin	9	5	4	
unbekannte Externa	11	6	5	
B) Chirurgische Therapien				
Exzision	10	8	2	
Elektrokoagulation	10	7	3	
Laser	7	4	2	1
Zirkumzision	2	2		

2.3.2 Klinische Untersuchung

Sämtliche klinischen Untersuchungen erfolgten standardisiert durch einen sehr erfahrenen, spezialisierten Urologen, der auch sämtliche nachfolgenden Laseroperationen durchführte.

Es erfolgte zunächst eine gründliche Inspektion der Genitoanalregion auf klinische Effloreszenzen wie Condylomata acuminata, pigmentierte und unpigmentierte Papeln, flachkondylomatöse Effloreszenzen und bowenoide Papulosen. Zur Detektion der bei alleiniger klinischer Inspektion nicht erkennbaren subklinischen Effloreszenzen sowie zur Abklärung fraglicher klinischer Effloreszenzen diente der Essigsäuretest (5 %, 5 Minuten) unter Verwendung einer Lupenvergrößerung (5 x). Subklinische Effloreszenzen wurden nur dann als charakteristisch angesehen, wenn die Weißreaktion scharf begrenzt war, Gefäßzeichnungen und typische mosaikartige Oberflächenstruktur sich abzeichneten, die Untersuchung schmerzlos, frei von klinischen Entzündungszeichen und reproduzierbar war. Bei Nichterfüllung der genannten Kriterien wurden Weißreaktionen zunächst als unspezifisch eingestuft und nach Behandlung mit entzündungshemmenden Kamille-Penisbädern eine erneute Essigsäuretestung nach 2-4 Wochen durchgeführt. Alle eindeutigen klinischen und subklinischen HPV-Läsionen wurden schließlich bezüglich Morphologie, Anzahl und Lokalisation dokumentiert und vor Therapie biopsiert. Bei unklaren Befunden wurde nach drei Monaten erneut eine Kontrolle durchgeführt und bei Fortbestehen biopsiert.

Der Meatus urethrae externus und die Perianalzone wurden ebenfalls gründlich auf HPV-Läsionen untersucht. Bei äußerlich erkennbaren Effloreszenzen wurden diese dokumentiert, eine weitere Abklärung mittels Urethroskopie und Rektoskopie erfolgte erst nach Sanierung der äußeren Läsionen, um eine iatrogene Virusaussaat zu vermeiden. Routinemäßige Urethroskopien erfolgten ohne Beteiligung des Meatus urethrae externus und der einsehbaren distalen Urethra nicht, da proximale Harnröhrenkondylome in diesen Fällen Raritäten darstellen [72, 87]. Endoskopie- und Biopsieergebnisse der urethralen HPV-Effloreszenzen wurden jedoch nicht in dieser Dissertation ausgewertet.

2.3.3 Laserbehandlung

Alle Laserbehandlungen des äußeren Genitale erfolgten in Lokalanästhesie oder Allgemeinnarkose durch Nd:YAG-Laserbestrahlung. Dabei wurde die Laserausgangsleistung des Lasergerätes (Dornier Fibertom 5010) auf 20 Watt eingestellt. Die HPV-Läsionen des äußeren Genitales wurden in der Regel über ein Laserhandstück mit Linseneinsatz bestrahlt, so daß durch Fokussierung/Defokussierung des Laserstrahls die Leistung zusätzlich reguliert werden konnte. Mit dem Laserhandstück nicht bzw. schwer erreichbare Genitalregionen wurden, vergleichbar der Laseranwendung in der Urethra, über Quarzglasfasern (600 µm Durchmesser) bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte grundsätzlich kontinuierlich (cw-Modus) bis zur Weißfärbung (Koagulation) des Epithels. Großflächige Läsionen wurden dabei zunächst an ihren Außengrenzen zirkulär mit dem Laser umfahren, um dann zeilenförmig das Zentrum der Läsion mit dem Laser zu denaturieren. Die Führung des unsichtbaren Nd:YAG-Laserstrahls (1064 nm) wurde dabei durch einen parallel in den Strahlengang eingekoppelten roten Pilotlaserstrahl (Helium-Neon-Laser, 630 nm) ermöglicht. Gewebeschwärzungen (Karbonisation) und anschließende Gewebsverdampfung (Evaporisation), wie sie für den CO₂-Laser charakteristisch sind, wurden mit dem Nd:YAG-Laser bewußt vermieden, um einerseits größere Tiefeneffekte des Laserlichtes zu erreichen, andererseits ungewollte HPV-Partikel-haltige Rauchentwicklung zu vermeiden. Bei mehrere Millimeter dicken HPV-Epithelläsionen wurde das koagulierte Gewebe abgetragen, um potentiell

vitale Gewebsreste am Tumorgrund erkennen und mit geringerer Laserleistung nachbehandeln zu können. Das abgetragene Material konnte zudem zu histologischen Untersuchungen oder HPV-Analysen noch genutzt werden. Sämtliche Laserbestrahlungen erfolgten unter Einhaltung der gültigen Laserschutzvorschriften in speziellen Räumlichkeiten und durch speziell geschultes Personal.

2.3.4 Routine-Kontrolluntersuchungen

Klinische Routine-Kontrolluntersuchungen wurden im Abstand von 3, 6 und 12 Monaten nach Lasertherapie empfohlen. Umfang und Art der Kontrolluntersuchungen entsprachen der bereits geschilderten HPV-Untersuchung. Nachgewiesene HPV-Effloreszenzen in diesen Untersuchungen wurden grundsätzlich als Rezidiv klassifiziert, da eine klare Abgrenzung zu einer möglicherweise unzureichend behandelten Läsion nicht möglich war. Diese Läsionen wurden einer erneuten Behandlung unterzogen. Eine erfolgreiche klinische HPV-Sanierung wurde erst bei einem unauffälligen Follow-up von 12 Monaten angenommen. Danach erfolgten keine weiteren Routineuntersuchungen.

2.3.5 Partneruntersuchung

Alle Männer wurden über die Notwendigkeit einer Untersuchung der Partnerin aufgeklärt und erhielten entsprechende Begleitschreiben an die behandelnden Gynäkologen mit der Bitte um HPV-Untersuchung und Mitteilung aller relevanten Untersuchungsbefunde bei vorliegendem Einverständnis der Frauen. Untersuchungen erfolgten entweder durch den vertrauten Gynäkologen der Frauen oder auf Wunsch durch unsere gynäkologischen Kooperationspartner der Frauenkliniken der LMU München. Allen Männern wurde bis zur klinischen Sanierung beider Geschlechtspartner der Gebrauch von Kondomen angeraten.

2.4 Studiendesign der prospektiven Untersuchungen

2.4.1 Zeitpunkt der Nachuntersuchung

Zum Kontrollzeitpunkt (1998) waren die Männer 20 bis 72 Jahre alt (Median 33 Jahre). 9 der 103 Männer haben sich nach Beendigung der Lasertherapie zwischenzeitlich außerhalb der urologischen Spezialambulanz behandeln lassen. Die Nachuntersuchung erfolgte im Schnitt 47,6 Monate (Range 1 Monat bis 10,5 Jahre, Median 4 Jahre) nach erster Lasertherapie. Tabelle 3 zeigt die Häufigkeitsverteilung des zeitlichen Follow-up-Intervalls von der Initialbehandlung bis zur Nachuntersuchung.

Tab. 3 : Zeitintervall zwischen Lasertherapie und Nachuntersuchung

Zeitintervall	Anzahl an Patienten	
	n=103	%
< 1 Jahr	17	16,5
1-2 Jahre	9	8,8
2-3 Jahre	14	13,6
3-4 Jahre	13	12,6
4-5 Jahre	13	12,6
> 5 Jahre	37	35,9

2.4.2 Klinische Untersuchung

Sämtliche Männer wurden nach schriftlicher Aufforderung und Einwilligung in die freiwillige Studie einer analog der bereits oben beschriebenen, klinischen HPV-Untersuchung unterzogen.

2.4.3 Probengewinnung

Es wurde bei der Nachuntersuchung von jedem Patienten eine Biopsie aus einer Lasernarbe und einem 1 cm davon entfernten unauffälligen Kontrollareal entnommen. Die Probenentnahme erfolgte dabei in Lokalanästhesie durch sterile Unterspritzung von 1 % Xylocain-Lösung. Sofern ein Patient ein

klinisches oder subklinisches Rezidiv aufwies, wurde auch von diesem eine Probe entnommen. Falls der Patient einige wenige Rezidive aufwies, wurden diese in gleicher Sitzung mit der Hautstanze mitentfernt. Lediglich bei ausgeprägtem Rezidivbefall, der eine erneute Lasertherapie in Allgemeinnarkose nötig machte, wurden die Proben intraoperativ entnommen, um eine unnötige Belastung des Patienten zu vermeiden.

Nach Desinfizieren und sterilem Abdecken des Biopsieareals wurden die Proben mit sterilen Einweg-Hautstanzen (Stiefel Biopsy Punch; \varnothing 3-4 mm) entnommen und senkrecht zur Hautoberfläche geteilt. Um Probenkontamination zu vermeiden, wurden für jede einzelne Biopsie jeweils separate sterile Hautstanzen, Pinzetten sowie Skalpell zum Zerteilen der Probe verwendet. Falls erforderlich, erfolgte Blutstillung und Wundverschluß mit selbstresorbierbarem Nahtgut (Vicryl Rapid 4.0).

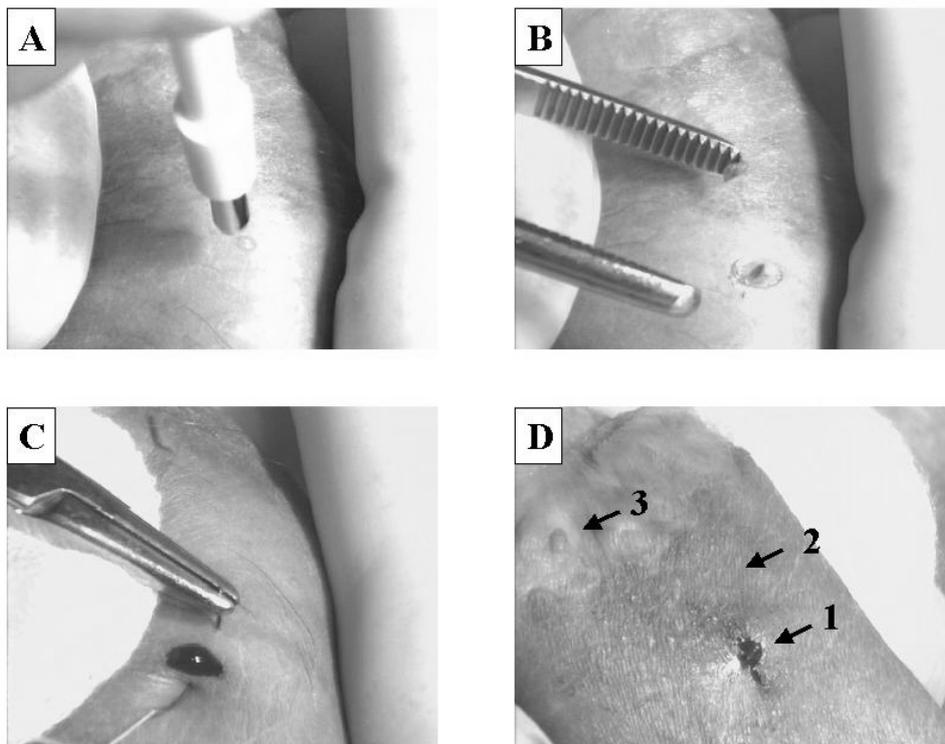


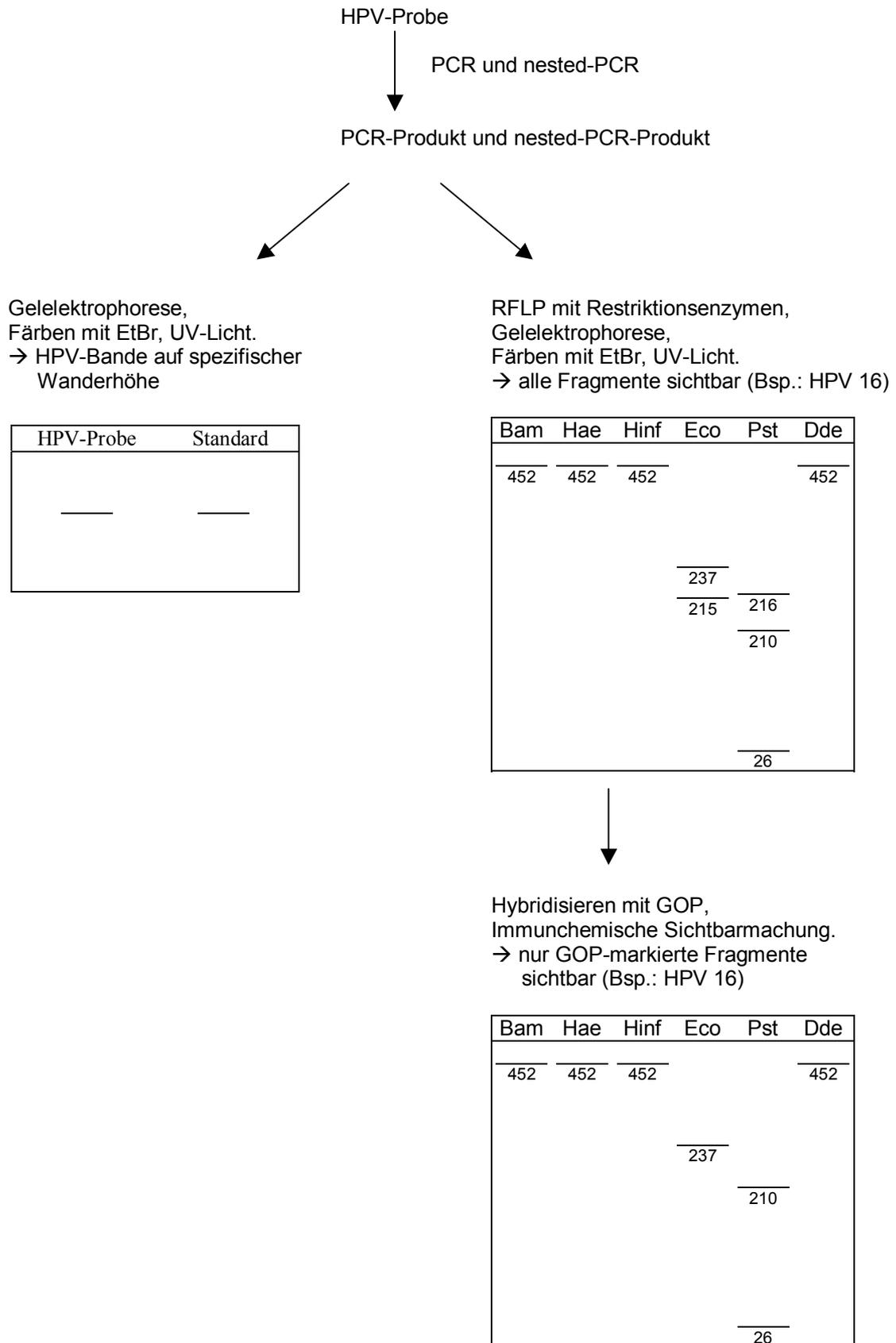
Abb 1 : Probengewinnung. A-C: Entnahme einer HPV-Läsion mit der Stanze und Naht der Wundränder. D: Übersicht der Biopsieareale: Lasernarbe, bereits biopsiert (1), unauffälliges Kontrollareal 1 cm von der Lasernarbe entfernt (2) und klinisches Rezidiv (3).

Die Biopsiehälften wurden in separaten kältebeständigen Gefäßen (Nunc Cryo Tubes®; Fa. Nalge Nunc, Rochester, NY, USA) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Lagerung bei –80 °C wurde jeweils eine Probenhälfte auf Trockeneis an das HPV-Referenzlabor weitergeleitet. Die andere Hälfte wurde zur histologischen Untersuchung vorgesehen.

2.4.4 HPV-Laboranalyse

Die HPV-Analyse des gewonnenen Probenmaterials erfolgte durch PCR und nested-PCR, wodurch mit größtmöglicher Sensitivität vorhandene HPV-DNA nachgewiesen werden konnte. Die anschließende HPV-Typbestimmung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus- (RFLP-) Analyse und Hybridisierung mit den Genus-spezifischen HPV-Sonden GOP (generic oligonucleotide probe) ermöglichte eine absolut spezifische Identifizierung nahezu aller heute bekannten HPV-Genotypen. Die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens wurde in einer multizentrischen Studie 1998 validiert [59]. Zum Ausschluß subjektiv beeinflusster Ergebnis-Interpretationen erfolgte die HPV-Analyse der Proben in verblindeter Weise. Eine schematische Übersicht über den HPV-Nachweis mit anschließender HPV-Typisierung gibt Abbildung 2.

Abb. 2 : Schematische Darstellung des HPV-Nachweises mittels PCR und der HPV-Typisierung durch Kombination von RFLP-Analyse und Hybridisierung mit den Genus-spezifischen Sonden GOP.



Isolierung der DNA

Das Probenmaterial wurde in 500 µl Tris-EDTA-Puffer suspendiert. Als Positivkontrolle diente verdünnte HeLa-Zell DNA-Lösung. Die DNA wurde durch Proteindenaturierung mittels SDS (Natriumdodecylsulfat; Fa. Serva, Heidelberg) und Proteinase K (Fa. Boehringer Mannheim) freigesetzt. Die anschließende Isolierung der DNA erfolgte durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanol-fällung. Die isolierte DNA wurde bei 60 °C getrocknet, das entstandene Pellet in 50 µl Aqua dest. resuspendiert.

In der Probe vorhandene Metallionen, die die PCR stören, wurden durch Komplexbildung gebunden. Dafür wurden je 25 µl DNA-Suspension mit 100 µl Chelex[®] 100 (200-400 mesh; Fa. Bio-Rad, München) gemischt und für 15 min auf 60 °C erwärmt. Die Chelex-Metallionen-Komplexe wurden anschließend durch Zentrifugation entfernt.

Amplifizierung der HPV-DNA mittels PCR

Die Amplifikation von HPV-DNA erfolgte mit unterschiedlichen Primern. Zum Nachweis genitaler HPV wurden die von Manos et al. [55] beschriebenen degenerierten Konsensus-Primer MY9 und MY11 verwendet. Diese amplifizieren ein ca. 450 bp langes DNA-Segment der konservierten HPV-L1-Region. Im Falle eines negativen Ergebnisses der MY-PCR wurde, um die Sensitivität weiter zu erhöhen, eine sogenannte nested-PCR mit den Primern MYN9 und MYN10 durchgeführt. Hierbei binden die nested-Primer innerhalb der DNA Region, die durch die Primer MY9 und MY11 begrenzt wird, wobei das aus dem ersten Amplifikationsschritt hervorgehende PCR-Produkt als Matrize der folgenden nested-PCR dient. Kutane Epidermodysplasia verruciformis (EV) assoziierte HPV wurde mit den von Berkhout et al. [6] publizierten Primern CP65, CP66, CP69 und CP70 amplifiziert, wobei die Primer CP66 und CP69 als nested-Primer verwendet wurden. Auch die CP-Primer sind aus konservierten HPV-L1-Regionen abgeleitet. Im Folgenden wird der Ablauf der PCR anhand der Primer MY9 und MY11 aufgezeigt, für die PCR-Bedingungen der anderen verwendeten Primer siehe Tabelle 4.

10 µl der extrahierten DNA wurden mit folgenden Substanzen versetzt: 10 µl 10 x PCR-Puffer (0,5 M KCl, 25 mM MgCl₂, 0,1 % Gelatine, 0,1 M Tris-HCl pH 8,3), 16 µl dNTP-Lösung (je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Fa. Boehringer Mannheim), jeweils 50 pmol der beiden verwendeten Primer (alle Primer von Fa. TIB Molbiol, Berlin), 2 U Taq-DNA-Polymerase (Ampli-Taq[®]; Fa. Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) und Aqua dest. ad 100 µl. Die angerichtete Lösung wurde mit 2 Tropfen Mineralöl bedeckt, um eine Verdunstung zu verhindern. Die PCR umfasste 40 Zyklen in einem DNA-Thermocycler (Fa. Perkin-Elmer), wobei das Temperaturprofil für die MY9/11-Primer wie folgt aussah: 1 min bei 94 °C zum Lösen der Doppelstränge in Einzelstränge, 1,5 min bei 55 °C zum Anlegen der Primer und 1 min bei 72 °C zur Verlängerung der Primer mittels Taq-Polymerase. Um eine vollständige Denaturierung der Ausgangs-DNA zu gewährleisten, erfolgte die initiale 94 °C-Inkubation über 10 min.

Tab. 4 : Zyklenzahl und Temperaturprofil der PCR-Analysen mit den verschiedenen Primer Kombinationen

Primer Paar	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer Extension	Zyklenzahl
MY9/11	94 °C, 1 min	55 °C, 1,5 min	72 °C, 1 min	40
MYN9/10	94 °C, 1 min	50 °C, 1,5 min	72 °C, 1 min	25
CP65/70	95 °C, 1 min	50 °C, 1,5 min	72 °C, 2 min	5
	95 °C, 1 min	55 °C, 1,0 min	72 °C, 2 min	35
CP66/69	95 °C, 1 min	55 °C, 1,0 min	72 °C, 2 min	30
BG1/2	94 °C, 1 min	55 °C, 1,5 min	72 °C, 1 min	40

Nachweis vorhandener HPV-DNA mittels Elektrophorese und Ethidiumbromidfärbung

Im Anschluß an jede PCR folgte mit 10 % des PCR-Produktes eine Elektrophorese auf 8 % Polyacrylamidgel und anschließende Ethidiumbromidfärbung. Sie diente dem Nachweis, ob HPV-DNA in der Probe vorhanden ist, gleich welchen Typs, und erlaubte anhand der Bandenintensität eine quantitative Abschätzung der DNA-Menge. Im positiven Falle befand sich der amplifizierte Teil der L1-Sequenz gemeinsam mit einem mitgelaufenen Standard DNA Molekular Gewicht (Marker V, 8-587 bp, 50 µg = 1 A₂₆₀ unit; Fa. Boehringer

Mannheim) stets auf einer charakteristischen Migrationsweite und wurde durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht als Bande sichtbar. Das Ergebnis wurde fotodokumentiert (siehe Abbildung 3).

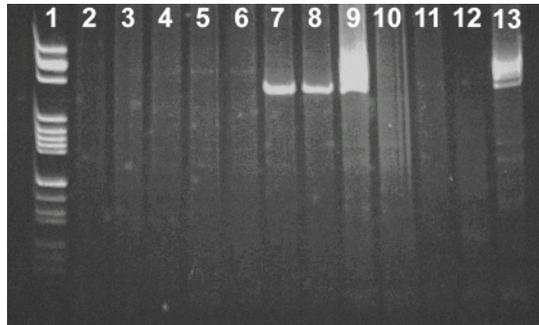


Abb. 3 : Nachweis von HPV-DNA in den PCR-Produkten verschiedener Patientenproben. Fotografie des mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels unter UV-Licht. Spur 1: DNA-Längenstandard (bBR322, *Hae*III), Spur 2-11: Patientenproben, Spur 12: Negativkontrolle, Spur 13: Positivkontrolle. Die Banden in den Spuren 7, 8, und 9 auf charakteristischer Migrationsweite zeigen das Vorhandensein von HPV in den entsprechenden Patientenproben.

HPV-Typbestimmung mittels RFLP-Analyse und anschließende Hybridisierung mit GOP

Die HPV-Typbestimmung erfolgte nun mittels RFLP- (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-) Analyse und anschließende Hybridisierung mit den Genus-spezifischen HPV-Sonden GOP (generic oligonucleotide probe).

RFLP-Analyse

Ein Restriktionsenzym schneidet eine DNA an Stellen mit bestimmten Basenkombinationen. Durch die Verwendung von mehreren Enzymen, die die L1-Region an jeweils definierten Stellen schneiden, ergibt die Kombination der Schnittmuster für jeden HPV-Typ ein spezifisches Bild, anhand dessen der zugrundeliegende HPV-Typ bestimmt werden kann.

Vor dem Schneiden der DNA muß das PCR-Produkt zunächst von Substanzen befreit werden, die die Restriktionsenzyme hemmen könnten. Dies geschah durch eine erneute Ethanolfällung.

Für die RFLP-Analyse wurden jeweils ca. 0,5 µg PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Hae*III, *Hin*fl, *Eco*RI, *Pst*I und *Dde*I inkubiert. Im Falle unschlüssiger Schnittmuster, wie sie z.B. bei Anwesenheit mehrerer HPV-Typen in der untersuchten Probe entstehen, erfolgte eine zusätzliche Analyse mit *Dra*I und *Sau*3A. Der Schneidevorgang des PCR-Produkts wurde mit 5 U je Enzym und geeignetem Puffer (SuRE/Cut[®] Buffer Set; Boehringer Mannheim) bei einer Gesamtmenge von 25 µl je Restriktionsenzymansatz für 2 Stunden bei 37 °C durchgeführt.

Da die z.T. hohen Salzkonzentrationen der Restriktionsenzymansätze das normale Laufverhalten der DNA-Fragmente bei der nachfolgenden Elektrophorese hemmen, wurde die DNA erneut mit Ethanol gefällt und in 10 µl Aqua dest. resuspendiert.

Die durch Restriktionsenzyme in definierte Teile geschnittene DNA wurde nun im 8 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch Ethidiumbromid angefärbt und erschienen unter UV-Licht als leuchtende Banden, die fotodokumentiert wurden (siehe Abbildung 4).

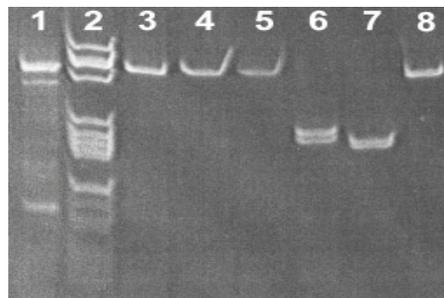


Abb. 4 : RFLP-Analyse. Fotografie des mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels unter UV-Licht. Spur 1: Positivkontrolle (nicht geschnittenes PCR-Produkt), Spur 2: DNA-Längenstandard (bBR322, *Hae*III), Spur 3-8: PCR-Produkte einer Patientenprobe nach Inkubation mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI (452 bp), *Hae*III (452 bp), *Hin*fl (452 bp), *Eco*RI (237 bp und 215 bp), *Pst*I (216 bp und 210 bp) und *Dde*I (452 bp). Das Bandenmuster der Restriktionsfragmente spricht für HPV 16. Ein durch *Pst*I erzeugtes weiteres Restriktionsfragment von 26 bp-Länge hat eine zu geringe Auflösung und kommt beim verwendeten 8 % Polyacrylamidgel nicht zur Darstellung.

Hybridisierung mit GOP

Das durch RFLP gewonnene Bandenmuster kann beim Vorhandensein einer größeren Menge an Restriktionsfragmenten, wie sie durch unspezifische PCR-Produkte oder mehrere enthaltene HPV-Typen auftreten, unerschlüssig sein. Um die Sensitivität wie auch Spezifität zu erhöhen, wurden die Restriktionsfragmente auf eine Nylonmembran übertragen und mit HPV Genus-spezifischen Sonden (GOP-X, GOP-Y, GOP-Z) hybridisiert, die an eine definierte Basensequenz der amplifizierten HPV-DNA binden. Eine anschließende immunchemische Reaktion macht dasjenige Restriktionsfragment sichtbar, das mit der GOP hybridisiert hat. Dadurch reduziert sich die Anzahl der sichtbaren Fragmente je Restriktionsenzym auf maximal eins pro vorhandenen HPV-Typ. Anhand des Musters der mit den GOP-Sonden hybridisierten Fragmente kann der zugrundeliegende HPV-Typ bestimmt werden.

Die drei Sonden stellen jeweils ein Gemisch aus verschiedenen degenerierten Biotin-markierten Oligonukleotiden dar. GOP-X ist eine Mischung aus 5 Oligonukleotiden, die mindestens 95 % Homologie zu allen bekannten Mukosa-assoziierten HPV Typen aufweist.

Die Sonde GOP-X ist aus der Region der "upstream" nested-Primer MYN9 und CP66 abgeleitet und ist daher in erster Linie für die Hybridisierung von MY9/MY11 Produkten geeignet. Die Sonden GOP-Y und GOP-Z sind aus einer DNA-Region unmittelbar stromabwärts der "upstream" nested-Primer abgeleitet und daher auch für die Hybridisierung der nested-PCR-Produkte geeignet. GOP-Z ist ein Gemisch aus 6 verschiedenen Oligonukleotiden. Die Homologie zu den bekannten Mukosa-assoziierten HPV-Typen beträgt mindestens 95 %. GOP-Y wurde speziell für die Identifizierung kutaner HPV konzipiert. Es stellt ein Gemisch aus 7 degenerierten Oligonukleotiden dar, die mit Ausnahme von HPV 41 mehr als 90 % Homologie zu allen bisher vollständig charakterisierten kutanen HPV-Typen aufweist.

Zur Hybridisierungsanalyse wurden die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente zunächst durch Übertragung auf eine Nylonmembran (Zeta-Probe[®]; Fa. Bio-Rad, München) immobilisiert. Die DNA-Doppelstränge wurden in Einzelstränge aufgetrennt, indem die Nylonmembran bei Raumtemperatur für 30 min mit Whatman 3MM Papier (Whatman Scientific, Kent, UK) inkubiert

wurde, das mit 0,5 M NaOH getränkt war. Um unspezifische Bindungsstellen der Nylonmembran abzusättigen, wurde sie für 4 Stunden bei 4 °C in Prähybridisierungslösung geschwänkt, die 1 % Blockierungsreagenz (Fa. Boehringer Mannheim), 0,5 % N-Laurylsarcosin und 0,02 % SDS enthielt. Die Hybridisierung mit den biotinmarkierten Sonden (Fa. TIB Molbiol, Berlin) in einer Konzentration von 5 µg/ml erfolgte in eingeschweißten Plastiktütchen bei 40 °C für 4 Stunden.

Beim anschließenden Waschvorgang wurden nicht oder nur sehr ungenau hybridisierte Sonden entfernt. Dazu wurde die Nylonmembran für jeweils 5 min in 1 x SSC (standard saline citrate; 0,15 M NaCl, 0,015 M NaCitrat, pH 7,0) mit 0,2 % SDS bei Raumtemperatur, dann in 0,1 x SSC mit 0,2 % SDS bei Raumtemperatur und zuletzt in 0,1 x SSC mit 0,2 % SDS bei 40 °C inkubiert.

Die nach dem stringenten Waschvorgang an der Nylonmembran haftenden biotinmarkierten Hybridisierungsprodukte wurden nun immunchemisch nachgewiesen. Dazu wurde die Nylonmembran mit AP-konjugiertem Streptavidin (Fa. Dianova, Hamburg) und anschließend mit NBT/BCIP (Nitroblautetrazolium / 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) (Fa. Sigma Chemical, München) inkubiert. Die Hybridisierungsprodukte wurden als bläuliche Banden sichtbar (siehe Abbildung 5).



Abb. 5 : HPV-Typisierung durch Hybridisierung der Restriktionsfragmente mit den Genus-spezifischen Sonden GOP. Immunchemische Darstellung der Hybridisierungsprodukte mit AP-konjugiertem Streptavidin und Inkubation mit NBT/BCIP. Spur 1: Positivkontrolle (nicht geschnittenes PCR-Produkt), Spur 2-7: Mit GOP hybridisierte Restriktionsfragmente von *Bam*HI (452 bp), *Hae*III (452 bp), *Hin*fI (452 bp), *Eco*RI (237 bp), *Pst*I (210 bp) und *Dde*I (452 bp). Es zeigt sich pro Restriktionsenzym eine Bande, das Bandenmuster entspricht HPV 16.

Kontrollmechanismen bei der HPV-Analyse

Prüfung der extrahierten DNA auf die Eignung zur PCR

Für eine aussagekräftige PCR-Analyse sind sowohl die ausreichende Menge intakter DNA als auch die Abwesenheit von Inhibitoren wichtige Grundbedingungen. Um zu überprüfen, ob die HPV-Probe diesbezüglich einwandfrei ist, wurde zusätzlich bei jeder HPV-Probe zelluläre DNA (β -Globin) amplifiziert. Die β -Globin-PCR erfolgte entsprechend der bereits beschriebenen HPV-PCR mit den Primern BG1 und BG2. Die Amplifikation umfasste 40 Zyklen à 1 min bei 94 °C, 1,5 min bei 55 °C und 1 min bei 72 °C. Bei negativem β -Globin PCR-Ergebnis (Zellmenge $<10^5$ im Ausgangsmaterial bzw. zerstörte DNA oder Inhibitoren) wurde die PCR mit der zweiten, tiefgefrorenen Biopsiehälfte wiederholt.

Kontrolle von Kontamination

Infolge der durch PCR ermöglichten exponentiellen Amplifikation der Ziel-DNA (Faktor 10^6 - 10^8) besteht jedoch auch eine große Gefahr für das Auftreten falsch-positiver Ergebnisse durch Kontamination. Um die Zuverlässigkeit der PCR-Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die PCR strikt unter Standard-sicherheitsbedingungen durchgeführt. In allen Arbeitsschritten mitgeführte Negativkontrollen (Aqua dest.) deuteten nie auf eine Probenkontamination hin.

2.5 Datenanalyse und statistische Methoden

Die Datenerhebung erfolgte anhand von Patientendokumentationsbögen. Alle Patientendokumentationsbögen wurden auf Vollständigkeit und Plausibilität überprüft. Die Daten wurden EDV-mäßig in einer Datenbank auf der Basis von Microsoft Access 97 erfasst.

Die Überprüfung der Richtigkeit der Daten erfolgte durch Range-, Validitäts- und Konsistenzchecks. Nach Eingabe sämtlicher Eintragungen wurde die Datenbank geschlossen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der validierten Standardsoftware SPSS für Windows (Version 10.0).

Die Auswertung absoluter Häufigkeiten von z.B. Rezidivzahlen in Abhängigkeit der Behandlung ergab Vierfeldertafeln. Statistisch wurden diese Daten anhand des Chi-Quadrat-Tests bzw. bei Unterschreiten des „expected value“ von fünf mit dem Fischer's Exakter Test ausgewertet.

Für die Auswertung skalierten Daten (wie z.B. Zeitintervalle) wurden nichtparametrische Testverfahren eingesetzt. Zum Vergleich einzelner Patientengruppen wurde der Whitney-Mann-Test für voneinander unabhängige Variablen eingesetzt. Vergleiche von Zeitintervallen gleicher Patientengruppen (z.B. vor und nach Therapie) wurden mit dem Wilcoxon-Test für zwei abhängige Variablen bzw. dem Friedman-Test für mehrere abhängige Variablen durchgeführt. Beim Vergleich mehrerer abhängiger Variablen wurden POST-HOC-Methoden zur Ermittlung der Einzelabhängigkeiten angewendet. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit $<5\%$ ($p < 0,05$) gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der retrospektiven, aktengestützten Datenerhebung

Alter und Vorbehandlung

103 Männer im Alter von 19 bis 71 Jahren (Median 29 Jahre) (siehe Tabelle 1) stellten sich in unserer HPV-Spezialsprechstunde vor. 38 der 103 (36,9 %) Männer waren bereits vor der Lasertherapie in der urologischen Klinik teils mehrfach erfolglos mit unterschiedlichen Methoden extern vorbehandelt worden (siehe Tabelle 2).

Befund

Bei der Erstuntersuchung der 103 Patienten in der HPV-Spezialsprechstunde konnten bei 84 Männern histologisch gesicherte Condylomata acuminata, bei 48 Männern subklinische Effloreszenzen und bei einem Mann eine bowenoide Papulose nachgewiesen werden. Davon zeigten 29 Männer Kondylome und zugleich subklinische Effloreszenzen, darunter 1 Patient eine zusätzliche bowenoide Papulose. Die anderen Männer hatten entweder nur Kondylome (n=55) oder nur subklinische Effloreszenzen (n=19).

Lokalisation der HPV-Effloreszenzen

Bei 72,8 % der Patienten wurden HPV-Läsionen multilokulär festgestellt. Die Lokalisationsverteilung gibt Tabelle 5 wieder. Es zeigt sich, daß subklinische HPV-Läsionen signifikant am häufigsten am Präputium, dem Präputiumrest nach Zirkumzision und dem Frenulum, welches der Vorhaut zugerechnet wurde, nachgewiesen werden konnten (42,7 %) (p=0,002; Chi-Quadrat-Test). Dagegen fanden sich klinische Effloreszenzen mit 46,6 % am häufigsten am Schaft.

Tab. 5 : Lokalisation der HPV-Effloreszenzen (n=103 Patienten)

	klinische HPV-Effloreszenzen [%]	subklinische HPV-Effloreszenzen [%]
Glans	13,6	14,6
Präputium	38,8	40,8
Präputiumrest	5,8	1,9
Schaft	46,6	7,8
Urethra incl. Meatus	29,1	nd
Skrotum	5,8	nd
peri-/intraanal	13,6	nd

nd = nicht durchgeführte spezielle Untersuchung

Zirkumzision

23 der 103 Männer hatten bereits eine Zirkumzision vor der Erstbehandlung in der urologischen Klinik, weitere 28 Patienten wurden im Rahmen der Lasertherapie beschnitten.

Klinische Effloreszenzen wurden in der Erstuntersuchung bei zirkumzidierten und nicht-zirkumzidierten Männern annähernd gleich häufig nachgewiesen (21/23 [91,3 %] vs. 63/80 [78,6 %]). Dagegen fanden sich bei zirkumzidierten Patienten signifikant weniger subklinische Läsionen als bei unbeschnittenen Männern (6/23 [26,1 %] vs. 42/80 [52,5 %]) (p=0,025; Chi-Quadrat-Test).

Die Lokalisationen der HPV-Effloreszenzen in Abhängigkeit vom Zirkumzisionsstatus gibt Tabelle 6 wieder. Es zeigt sich, daß bei nicht-zirkumzidierten Männern mit 91,2 % signifikant am häufigsten das Präputium von klinischen oder subklinischen HPV-Effloreszenzen betroffen war (p=0,001; Fischer's Exakter Test). Dagegen fanden sich HPV-Effloreszenzen bei beschnittenen Männern signifikant am häufigsten am Penischaft (91,3 %) (p=0,001; Chi-Quadrat-Test).

Tab. 6 : Lokalisation der HPV-Effloreszenzen in Abhängigkeit vom Zirkumzisionsstatus

	nicht zirkumzidiert (n=80) [%]	zirkumzidiert (n=23) [%]
Glans	30,0	13,0
Präputium	91,2	-
Präputiumrest	-	34,8
Schaft	41,3	91,3
Urethra incl. Meatus	26,3	39,1
Skrotum	5,0	8,7
peri-/intraanal	13,8	13,0

Therapie und Rezidive

Nach Laserbehandlung waren 52 Patienten unter klinischen Gesichtspunkten vollständig saniert. Bei 51 Patienten traten zum Teil mehrere (1-6) Rezidive auf, die in entsprechend wiederholten Lasersitzungen behandelt wurden. Einen Überblick über die Anzahl der Rezidive nach initialer Laserbehandlung gibt Abbildung 6.

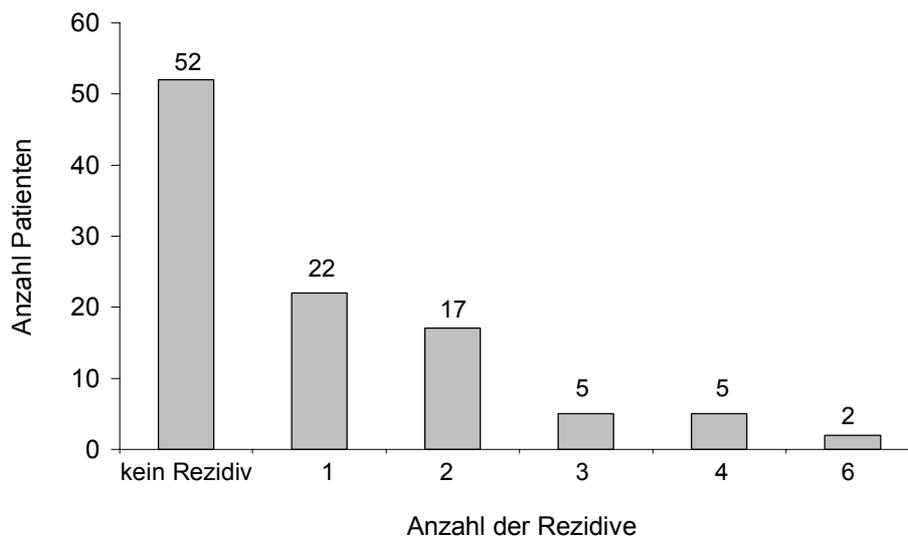


Abb. 6 : Anzahl der Rezidive nach initialer Laserbehandlung

Der Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs nach primärer Laserbehandlung lag im Median bei 3 Monaten (Range 1-27 Monate), zwischen den weiteren Rezidiven und wiederholten Laserbehandlungen änderten sich die jeweiligen Zeitintervalle nicht signifikant (Friedmann-Test). Die Zeit bis zum ersten Rezidiv dauerte jedoch bei zirkumzidierten Patienten mit im Median 5 Monaten signifikant länger als bei nicht-zirkumzidierten Männern mit 3 Monaten ($p=0,031$; Whitney-Mann-Test). Nach Kontrolluntersuchungen über 1 Jahr wurden ca. 95 % der erstmalig aufgetretenen Rezidive festgestellt (siehe Abbildung 7) und einer erneuten Lasertherapie zugeführt. Patienten, die bereits vor der Lasertherapie mit unterschiedlichen Methoden behandelt worden waren, zeigten im Rahmen der Routineuntersuchungen mit im Schnitt 3,6 Rezidiven pro Jahr eine vergleichbare Rezidivhäufigkeit wie nicht vorbehandelte Patienten mit 3,9.

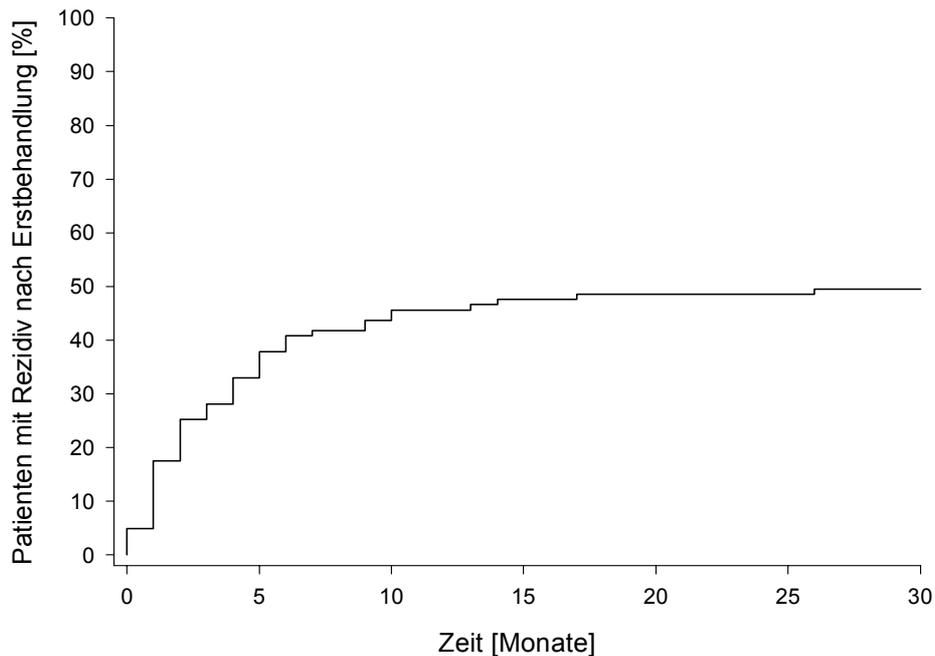


Abb. 7 : Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs nach Erstbehandlung

Partneruntersuchung

Im Zeitraum der Erstvorstellung des Patienten wurden insgesamt 96 Partnerinnen auf klinische und subklinische HPV-Infektionen untersucht, 7 Patienten gaben an, derzeit keine feste Partnerin bzw. keinen Kontakt mehr zur letzten Partnerin zu haben. 47 Frauen wurden primär von ihrem Gynäkologen untersucht und waren an HPV erkrankt, bei 49 Partnerinnen wurde eine Untersuchung eingeleitet. Dies geschah in 11 Fällen durch den Arzt, der uns den Patienten zugewiesen hat, in 38 Fällen wurde über unsere Spezialambulanz eine Untersuchung der Partnerin eingeleitet. Bei 15 der 49 eingeleiteten Untersuchungen zeigten sich HPV-Manifestationen. Insgesamt konnten somit bei 62 von 96 (64,6 %) untersuchten Partnerinnen zeitgleich klinische und/oder subklinische HPV-Effloreszenzen festgestellt werden.

3.2 Ergebnisse der prospektiven Untersuchungen

3.2.1 Klinischer Untersuchungsbefund

Die Untersuchung des äußeren Genitale zeigte bei 31 der 103 (30,1 %) Patienten zumeist sehr kleine (<2 Millimeter) klinische und/oder subklinische HPV-Effloreszenzen: 23 Männer wiesen ausschließlich Condylomata acuminata auf, 4 Männer Kondylome zusammen mit subklinischen Effloreszenzen, und 4 Männer hatten nur subklinische Effloreszenzen. Ein Patient der letztgenannten Gruppe, der nur 2 Monate zuvor wegen histologisch gesicherter Condylomata acuminata an der Glans penis mit dem Laser behandelt und zusätzlich zirkumzidiert worden war, zeigte bei der studienbedingten Nachuntersuchung eine flache, mit dem bloßen Auge kaum sichtbare, Essigsäure-positive Läsion an der Zirkumzisionsnarbe. Die Histologie dieser Effloreszenz ergab überraschend ein oberflächliches Peniskarzinom (pT₁, G₂). Diese Effloreszenz wurde als subklinische HPV-Läsion bewertet.

Im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsbefund vor Lasertherapie gab es in der Follow-up-Untersuchung unter den 103 Patienten einen signifikanten Rückgang sowohl der Anzahl der Männer mit klinischen Effloreszenzen von 84 (81,6 %) auf 27 (26,2 %) als auch derer mit subklinischen Effloreszenzen von 48 (46,6 %) auf 8 (7,8 %) (jeweils p<0,001; Chi-Quadrat Test) (vgl. Abbildung 8).

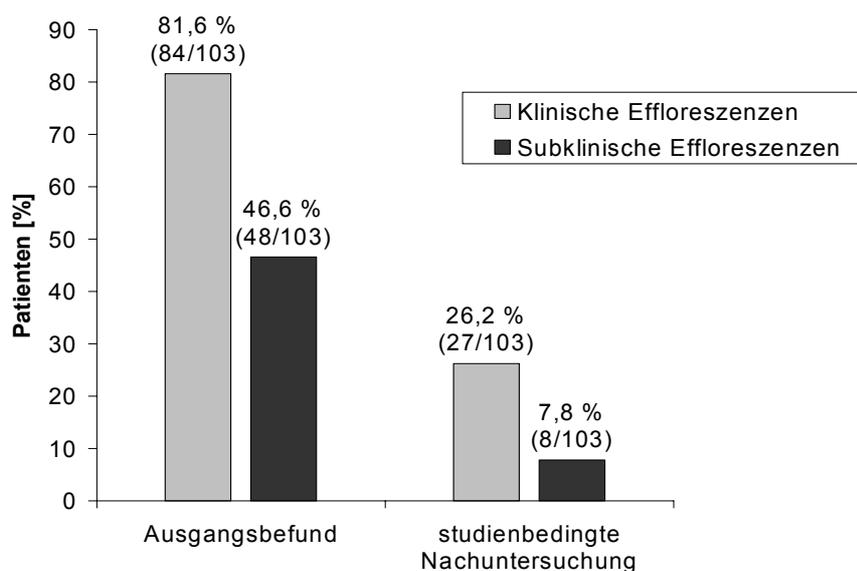


Abb. 8 : Häufigkeit klinischer und subklinischer Infektionen bei Initial- und studienbedingter Nachuntersuchung

Bei 8 der 31 (25,8 %) Patienten wurden HPV-Läsionen multilokulär festgestellt. Tabelle 7 gibt die Lokalisationsverteilung der einzelnen HPV-Effloreszenzen wieder. Analog der Initialuntersuchung fanden sich bei der studienbedingten Nachuntersuchung subklinische Effloreszenzen am häufigsten im Bereich des Präputiums (16,1 %), eine statistische Signifikanz konnte jedoch im Chi-Quadrat-Test nicht nachgewiesen werden. Dagegen fanden sich klinische Effloreszenzen mit 71,0 % signifikant am häufigsten am Penischaft (p=0,005; Chi-Quadrat-Test).

Tab. 7 : Lokalisationen der HPV-Effloreszenzen bei der studienbedingten Nachuntersuchung (n=31 Patienten)

	klinische HPV-Effloreszenzen [%]	subklinische HPV-Effloreszenzen [%]
Glans	6,5	3,2
Präputium	12,9	16,1
Präputiumrest	16,1	0,0
Schaft	71,0	6,5
Urethra incl. Meatus	nd	nd
Skrotum	6,5	nd
peri-/intraanal	9,7	nd

nd = nicht durchgeführte spezielle Untersuchung

72 der 103 Männer waren nach klinisch-ärztlichen Gesichtspunkten durch die Nd:YAG-Lasertherapie vollständig saniert. Demgegenüber glaubten 90 der 103 Patienten fest, geheilt zu sein. 13 Patienten waren sich dessen nicht sicher, da sie bereits erneut kleine Hautveränderungen am Genitale bemerkt hatten, ohne jedoch selbständig eine ärztliche Kontrolle veranlasst zu haben.

Zirkumzision

In der Gruppe beschnittener Patienten wurden in der Nachuntersuchung ebenso viele Männer mit HPV-Rezidiven (15 von 51) beobachtet wie bei den nicht beschnittenen Patienten (16 von 52).

Wie bereits bei der Initialuntersuchung wurden auch in der Nachuntersuchung klinische Effloreszenzen bei zirkumzidierten und nicht-zirkumzidierten Männern annähernd gleich häufig nachgewiesen (14/51 [27,5 %] vs 13/52 [25,0 %]). Wiederum fanden sich bei zirkumzidierten Männern weniger subklinische

Läsionen als bei unbeschnittenen Männern (2/51 [3,9 %] vs 6/52 [11,5 %]), eine statistische Signifikanz konnte jedoch im Chi-Quadrat-Test nicht nachgewiesen werden. Bei den zwei zirkumzidierten Patienten mit subklinischen Effloreszenzen fanden sich diese nicht im Bereich des Präputiumrests, sondern an Glans penis bzw. Penisschaft, was in diesem Zusammenhang erwähnt werden sollte.

Die Lokalisationen der klinischen und subklinischen HPV-Rezidive in Abhängigkeit vom Zirkumzisionsstatus sind in Tabelle 8 aufgeführt. Es zeigt sich analog der Initialuntersuchung, daß bei beschnittenen Männern der Penisschaft am häufigsten betroffen war (73,3 %). Bei nicht-zirkumzidierten Patienten wurden bei der Nachuntersuchung jedoch am Präputium (43,8 %) etwas weniger HPV-Effloreszenzen nachgewiesen als am Penisschaft (68,8 %).

Tab. 8 : Lokalisation der HPV-Effloreszenzen in Abhängigkeit vom Zirkumzisionsstatus

	nicht zirkumzidiert (n=16) [%]	zirkumzidiert (n=15) [%]
Glans	0,0	20,0
Präputium	43,8	-
Präputiumrest	-	33,3
Schaft	68,8	73,3
Urethra incl. Meatus	nd	nd
Skrotum	12,5	0,0
peri-/intraanal	12,5	6,7

nd = nicht durchgeführte spezielle Untersuchung

Behandlungsanzahl/-dauer

Das Auftreten von HPV-Rezidiven in der studienbedingten Nachuntersuchung zeigte sich unabhängig von Behandlungsanzahl und -dauer. So wiesen einmalig gelaserte Patienten (17/52) in der Nachuntersuchung annähernd gleich häufig klinische oder subklinische Rezidive auf wie mehrfach gelaserte Patienten (14/51). Auch fand sich bei Patienten mit HPV-Rezidiv kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf die Behandlungsdauer gegenüber Patienten ohne Rezidiv (Whitney-Mann-Test).

3.2.2 HPV-Laborergebnisse

Die labortechnische Untersuchung der Biopsien wies bei allen klinischen und subklinischen Rezidiven mit Ausnahme des Peniskarzinoms HPV-DNA nach. Ferner enthielten 29 der 103 klinisch unauffälligen Lasernarben und 24 der 103 ebenfalls unverdächtigen Kontrollbiopsien latente HPV-Infektionen. Tabelle 9 zeigt die HPV-Genotypen, die in sämtlichen Rezidiven, Lasernarben und Kontrollbiopsien festgestellt wurden.

Tab. 9 : Nachgewiesene HPV-Genotypen in HPV-positiven Probebiopsien von klinischen und subklinischen Rezidiven, Lasernarben und Kontrollbiopsien von 103 Männern nach Lasertherapie

HPV-Typ	klinische Rezidive n=27	subklin. Rezidive n=7	Lasernarben n=29	Kontroll- biopsien n=24	Häufigkeit der HPV-Typen insgesamt
<i>Typ 5</i>	1 x	-	2 x	3 x	6 x
<i>Typ 6</i>	17 x	3 x	9 x	9 x	38 x
<i>Typ 9</i>	1 x	-	-	-	1 x
<i>Typ 11</i>	3 x	-	1 x	1 x	5 x
<i>Typ 14</i>	-	-	1 x	-	1 x
Typ 16	-	1 x	5 x	4 x	10 x
<i>Typ 17</i>	-	-	1 x	1 x	2 x
Typ 18	1 x	-	2 x	1 x	4 x
<i>Typ 19</i>	-	-	-	1 x	1 x
<i>Typ 20</i>	-	-	1 x	1 x	2 x
Typ 31	1 x	-	-	1 x	2 x
Typ 33	-	1 x	-	-	1 x
<i>Typ 36</i>	-	-	1 x	1 x	2 x
<i>Typ 40</i>	1 x	-	1 x	-	2 x
<i>Typ 42</i>	2 x	2 x	1 x	1 x	6 x
<i>Typ 44</i>	2 x	-	-	1 x	3 x
Typ 45	1 x	-	-	-	1 x
Typ 52	-	-	1 x	-	1 x
<i>Typ 53</i>	-	-	1 x	-	1 x
Typ 58	-	-	-	2 x	2 x
<i>Typ 61</i>	-	-	1 x	-	1 x
<i>Typ 64</i>	1 x	-	-	-	1 x
Typ 68	-	-	1 x	-	1 x
<i>Typ 73</i>	-	1 x	1 x	1 x	3 x
<i>Typ 74</i>	-	-	1 x	-	1 x
<i>Typ X</i>	-	-	1 x	2 x	3 x
IA06	-	-	1 x	1 x	2 x
CP6108	1 x	-	1 x	-	2 x

Typ X: Biopsie enthält HPV-DNA, jedoch ist der Typ nicht identifizierbar.
 IA06, CP6108: Kürzlich publizierter putativ neuer HPV-Typ mit noch nicht vollständig analysierter DNA-Sequenz.
 Fette Markierung: High-risk-HPV-Typen [75].
 Kursive Markierung: Kutane EV-assoziierte HPV-Typen [33, 35, 61].

Es konnten insgesamt 27 verschiedene HPV-Genotypen eindeutig identifiziert werden. Lediglich bei drei Proben war es nicht möglich, die vorhandene HPV-DNA einem bestimmten Genotyp zuzuordnen (HPV Typ X).

In den Lasernarben wurden 20 verschiedene HPV-Genotypen, in den Kontrollbiopsien 16 verschiedene Genotypen und in den Rezidiven 15 verschiedene Genotypen festgestellt.

Der dominierende HPV-Typ in allen drei Gruppen war HPV 6. Weitere relativ häufig gefundene HPV-Typen waren in den Lasernarben und Kontrollproben die Typen 16 und 5, sowie in den Rezidiveffloreszenzen die Typen 11, 42, 44.

In klinischen Rezidiven überwogen deutlich die benignen HPV-Genotypen. So konnten in 27 klinischen Rezidiven 29 Low-risk- gegenüber nur 3 High-risk-Typen nachgewiesen werden. In 7 HPV-positiven subklinischen Rezidiven fanden sich 6 Low-risk-, sowie auch 2 High-risk-HPV-Typen.

Es wurden in den entnommenen Biopsien neben mukosaassoziierten HPV-Typen auch die als kutan geltenden, Epidermodysplasia verruciformis (EV) assoziierten [33, 35, 61] HPV-Genotypen 5, 9, 14, 17, 19, 20 und 36 diagnostiziert. Dabei wurde einmal der HPV-Typ 5 in einem Condyloma acuminatum zusammen mit einem mukosaassoziierten Typ und der HPV-Typ 9 in einem anderen Kondylom als alleiniger HPV-Typ nachgewiesen, die restlichen EV HPV fanden sich etwa gleich häufig in Lasernarben und unauffälligen Kontrollproben.

Bei insgesamt 46 Männern wurde in der DNA-Analyse HPV labortechnisch festgestellt. Von diesen wurde bei 31 Patienten nur ein HPV-Typ, bei 10 Patienten zwei HPV-Typen, bei vier Männern drei verschiedene HPV-Typen und bei einem Patienten sogar vier verschiedene HPV-Typen nachgewiesen. 30 der HPV-positiven Männer trugen einen Low-risk-HPV-Typ, neun Patienten Low-risk- und High-risk-HPV-Typen und sieben Männer ausschließlich High-risk-Typen (vgl. Abbildung 9).

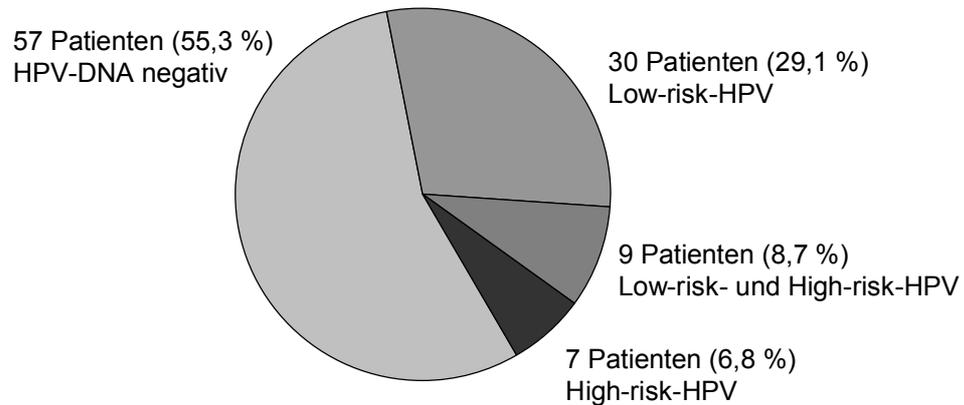


Abb. 9 : HPV-Positivität der Lasernarben, Kontrollbiopsien und Rezidive im HPV-Labor

Patienten mit klinischem/subklinischem Rezidiv (n=30) mit Ausnahme des Karzinoms, welches keine HPV-DNA enthielt, hatten in acht Fällen in allen drei Biopsiestellen den gleichen HPV-Typ. In fünf Fällen stimmte Rezidiv und Lasernarbe und in weiteren fünf Fällen Rezidiv und Kontrollbiopsie labortechnisch überein, in den restlichen 12 Fällen gab es keinerlei Übereinstimmungen der HPV-Typen.

Bei 65 Männern waren die Lasernarben und Kontrollbiopsien HPV-negativ, bei den restlichen 38 Patienten konnten darin latente HPV-Infektionen nachgewiesen werden. Dabei zeigten diese nur 1 cm voneinander entfernten Biopsieentnahmestellen neunmal vollständig identische HPV-Typ-Muster, dreimal teilweise übereinstimmende und 26-mal vollständig unterschiedliche HPV-Typen.

Lediglich bei 56 Männern konnte weder die klinische Untersuchung noch die Laboranalyse eine persistierende HPV-Infektion nachweisen.

Der Nachweis von HPV-DNA im Labor zeigte sich unabhängig von Behandlungsanzahl und -dauer. So waren einmalig gelaserte Patienten ebenso häufig HPV-positiv (23 von 51) wie Patienten, die aufgrund von Rezidiven mehrfach mit dem Laser behandelt wurden (23 von 52). Auch hinsichtlich der

aktenkundigen Behandlungsdauer gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit positiver und denen mit negativer HPV-Biopsie (Whitney-Mann-Test).

3.2.3 Zusammenfassung klinischer und labortechnischer Parameter

Eine zusammenfassende Übersicht über den HPV-Status der 103 Patienten bei der Nachuntersuchungsstudie, der durch klinische Untersuchung sowie durch labortechnische Analyse der Rezidive, Lasernarben und Kontrollproben bestimmt wurde, gibt Abbildung 10. Im Rahmen der klinischen Untersuchung fand sich im Mittel 4 Jahre nach Lasertherapie bei 31 Patienten ein klinisches oder subklinisches Rezidiv. Die restlichen 72 Patienten schienen unter klinischen Gesichtspunkten saniert zu sein. Jedoch konnte bei 16 der 72 Patienten eine latente Infektion in der Lasernarbe oder der angrenzenden Genitalhaut persistierend nachgewiesen werden. Bei 56 Patienten konnte selbst mit aufwendigsten labortechnischen Verfahren eine HPV-Infektion nicht mehr ermittelt werden.

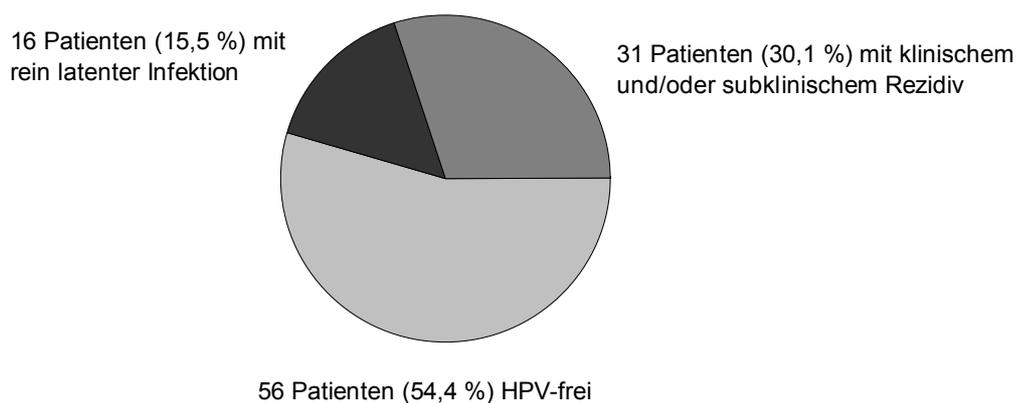
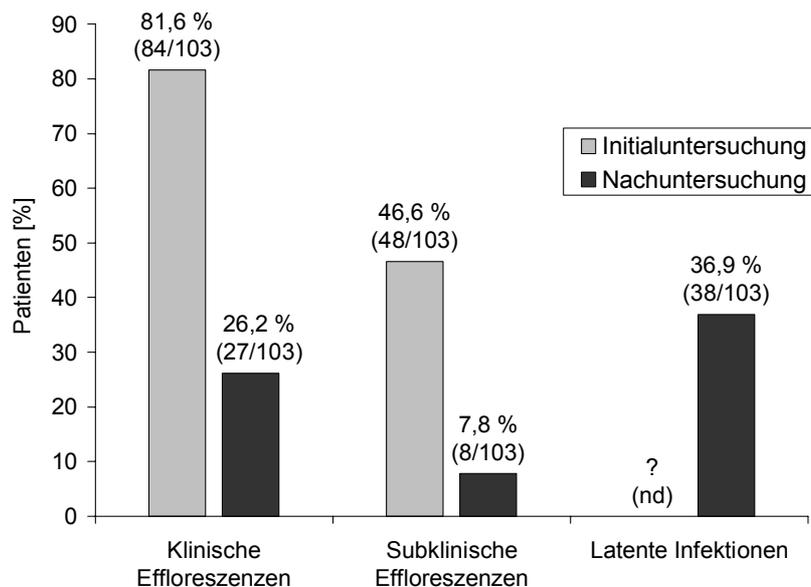


Abb. 10 : HPV-Status der 103 Patienten bei der Nachuntersuchungsstudie

Eine Zusammenstellung der Häufigkeit klinischer, subklinischer und latenter HPV-Infektionen bei Initial- und Nachuntersuchung gibt Abbildung 11. Insgesamt fanden sich mehr klinische Effloreszenzen als subklinische Läsionen. Bei zusätzlichen Laborbestimmungen waren latente HPV-Infektionen allerdings am häufigsten nachzuweisen.



nd = nicht durchgeführte spezielle Untersuchung

Abb. 11 : Häufigkeit klinischer, subklinischer und latenter Infektionen bei Initial- und studienbedingter Nachuntersuchung

4 Diskussion

Literaturübersicht über Ergebnisse der HPV-Lasertherapie

Der Erfolg jeder Therapiemethode zur Behandlung von genitoanal HPV-Effloreszenzen, gleich ob medikamentös oder chirurgisch, wird letztlich von zwei Faktoren bestimmt, der primären Sanierungsrate und der sekundären Rezidivrate.

Bei Auswertung der Literatur schneiden der Nd:YAG-Laser und die anderen chirurgischen Methoden bezüglich der Sanierungsrate durchschnittlich besser ab als die medikamentösen Therapieoptionen [8, 37, 56]. Jedoch nicht nur unter Verwendung verschiedener Therapieformen, sondern auch bei Festlegung beispielsweise auf die Lasertherapie, wird über unterschiedliche Behandlungserfolge berichtet. Tabelle 10 faßt die Ergebnisse von Studien über die Laserbehandlung von HPV-Effloreszenzen zusammen. Dabei zeigt sich, daß der beschriebene Erfolg abhängig ist von einer Reihe unterschiedlicher Faktoren.

Tab. 10 : Lasertherapie von HPV-Effloreszenzen

Autor	Laser	Anzahl Patienten [n]	Anzahl Behandlungen [n]	Sanierungsrate [%]	Rezidivrate [%]	follow-up [Mo]	klin. Effl.	subklin. Effl.
[2]	CO ₂	110	≥1	97,2	5,5	k.A.	+	
[5]	CO ₂	242	≥1	100	0	12	+	
[15]	CO ₂	90	≥1	100	16,7	9-12	+	
[17]	CO ₂	127	1	k.A.	66	4		+
[26]	CO ₂	40	1	100	7,5	16	+	
[27]	CO ₂	70	1	69-83	10-20	9	+	+
[50]	CO ₂	74	1	25-78	k.A.	14-34	+	
[52]	CO ₂	62	1	27	k.A.	0,5	+	
[68]	CO ₂	284	k.A.	k.A.	36	k.A.	+	+
[69]	CO ₂	80	≥1	100	12,5	12	+	+
[68]	Nd:YAG	80	k.A.	k.A.	5	k.A.	+	+
[70]	Nd:YAG	149	k.A.	k.A.	22	6	+	+
[79]	Nd:YAG	24	1	100	8,3	k.A.	+	

Bei der Bewertung der einzelnen Sanierungsraten nach Lasertherapie ist zu eruieren, wie häufig die Patienten in der entsprechenden Studie gelasert

wurden, bis sie statistisch als saniert klassifiziert wurden. So beinhalten Studien mit hohen Heilungsraten in der Regel Patienten, die zum Teil mehrfach gelasert wurden [2, 5, 15, 69], während Studien mit einmalig gelaserten Patienten meist geringere Heilungsraten aufweisen [17, 27, 50, 52].

Der in der vorliegenden Studie mit dem Nd:YAG-Laser erreichte primäre Sanierungserfolg ist vergleichsweise sehr gut, da sich Rezidive letztlich nie in zuvor behandelten Arealen befanden. Jedoch mußte sich knapp die Hälfte der Patienten bis zum Erreichen einer anhaltenden klinischen Sanierung zwei bis sechs Laserbehandlungen unterziehen.

Auch ist der angegebene Behandlungserfolg häufig abhängig von der zugrundeliegenden Untersuchungsart. So beurteilen viele Arbeitsgruppen die Sanierungsrate durch Lasertherapie allein aufgrund der Beseitigung aller mit bloßem Auge sichtbaren klinischen Effloreszenzen. Dabei zeigen sich in der Regel bessere Resultate als bei den Studien, die auch die nur mittels Markierungs- und Vergrößerungstechniken darstellbaren subklinischen Effloreszenzen in ihrer Bewertung mit berücksichtigen [17, 18].

Virale Clearance nach Lasertherapie

In allen bislang veröffentlichten Studien wurde die Sanierungsrate allein anhand von klinischen Gesichtspunkten festgelegt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun erstmals zusätzlich mit der viralen Clearance nach Lasertherapie.

Da frühere Untersuchungen gezeigt haben, daß genitoanale HPV-Infektionen in latenter Form multifokal vorkommen können [28, 62, 67], war es notwendig, Kontrollproben im klinisch unauffälligen Behandlungsumfeld mit zu untersuchen. Nach Nd:YAG-Lasertherapie konnten wir latente HPV-Infektionen bei 27,2 % der Patienten in den reizlos abgeheilten Lasernarben und bei 23,3 % in der unauffälligen angrenzenden Genitalhaut nachweisen. Anscheinend ist es durch Lasertherapie allein nicht möglich, die Virus-DNA komplett zu beseitigen.

Interessanterweise wurden in den Lasernarben trotz teilweise nachgewiesener latenter HPV-Infektion auch viele Jahre nach Lasertherapie keine Rezidive von uns beobachtet. Möglicherweise besteht im Behandlungsgebiet eine besondere virale Kontrolle durch das Immunsystem. Frühere Studien haben klar die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung, Persistenz, Progression und Remission von genitoanal HPV-Infektionen belegt [74]. Histologische Untersuchungen

von spontan rückbildenden Genitalwarzen zeigten eine signifikante Anreicherung von CD4⁺ Zellen und Makrophagen in Epidermis und Dermis [23]. Möglicherweise wird durch die Lasertherapie eine lokale Entzündungsreaktion in Gang gesetzt, in deren Folge latent persistierende HPV durch das Immunsystem lokal an einer erneuten Proliferation und Bildung klinischer oder subklinischer Effloreszenzen gehindert werden [73]. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Rezidive außerhalb der Laserbehandlungsareale belegen aber, daß der Effekt der Beeinflussung des Immunsystems sich nicht auf das gesamte Genitale oder den Gesamtorganismus zu erstrecken scheint.

Die Wirkung des Nd:YAG-Lasers beruht auf einer Volumenabsorption der Laserlichtenergie, wodurch es bei einer leistungsabhängigen Tiefenwirkung bis zu 8 mm zu einer Koagulation des Gewebes kommt [41]. Möglicherweise bietet die Schichtungsstörung des vernarbten, laserkoagulierten Epithels ungünstige Voraussetzungen für die produktive Virusvermehrung [73]. Eine DNA-Replikation, Proteinsynthese und Bildung reifer Virionen ist bekanntlich streng mit der Differenzierung der Keratinozyten im Plattenepithel assoziiert [61, 80]. Demgegenüber konnte man nach Behandlung mit dem CO₂-Laser, der eine Vaporisation oberflächlicher Epithelschichten bewirkt, in Lasernarben und an deren Rand HPV-Rezidive in bis zu 67 % beobachten [28]. In dieser Hinsicht scheint ein klarer Vorteil des Nd:YAG-Lasers in der höheren Eindringtiefe zu liegen, jedoch sind zu einer exakten Bewertung dieses Sachverhalts vergleichende Untersuchungen zwischen den beiden Lasersystemen notwendig.

Rezidive von HPV-Läsionen

Neben dem Bewertungsparameter „Sanierung“ ist der Erfolg einer Therapiemethode auch abhängig von der Definition eines „Rezidivs“.

HPV-Rezidive können nach primär erfolgreicher Sanierung des Genitale nicht nur im Behandlungsgebiet, sondern auch andernorts auftreten. Während die Rezidive im Behandlungsgebiet den Erfolg einer Behandlungsmethode schmälern, sind Rezidive außerhalb des Behandlungsgebietes der Therapiemethode nicht direkt anzulasten und insofern schwierig zu bewertende Rezidive. Was der Arzt nicht als Mißerfolg seiner Behandlung wertet, empfindet der Patient aber als Rezidiv und Versagen der vorgenommenen Behandlung.

Sämtliche von uns diagnostizierten klinischen und subklinischen Rezidive lagen bemerkenswerterweise außerhalb der Lasernarben. Wahrscheinlich sind diese Rezidive aus den weitläufigen latenten Infektionen hervorgegangen, die auch wir durch unsere stichprobenartigen Kontrollbiopsien bestätigen konnten [28]. Eine weitere mögliche Erklärung für einen Teil der Rezidive wäre eine Reinfektion durch eine unzureichend behandelte oder neue, infizierte Partnerin. Teilweise in Lasernarben und Genitalkontrollproben von uns nachgewiesene unterschiedliche HPV-Genotypen deuten auf diese Möglichkeit hin.

Offenbar kommt es im Rahmen der durch den Nd:YAG-Laser verursachten Gewebeerstörung von HPV-Effloreszenzen allenfalls zu einer lokalen Aktivierung des Immunsystems. Eine wirksame generalisierte Immunantwort, welche das gesamte Genitale schützt, scheint durch die Lasertherapie nicht induziert zu werden, sonst hätte es nicht zur Rezidivbildung außerhalb des Behandlungsgebietes kommen dürfen.

Jedoch zeigten sich selbst Therapieoptionen gegen HPV-Infektionen, die auf eine Aktivierung des Immunsystems zielten, wie beispielsweise Interferon, bisher wenig effektiv, um Rezidivbildungen generell zu verhindern [74].

Auch eine prophylaktische, weitläufige Behandlung des zu HPV-Läsionen angrenzenden Epithels mit dem CO₂-Laser ergab außer einer Reihe von Komplikationen keine effektive Reduzierung der Rezidivrate [64].

Die latenten HPV-Infektionen stellen somit ein therapeutisch bisher ungelöstes Problem dar. Zwar ist es mittels verschiedener Therapiemethoden möglich, eine lokale Sanierung von HPV-Effloreszenzen zu erreichen. Jedoch stellen die latenten HPV-Infektionen ein potentiell Reservoir für im Genitale rezidivierende HPV-Läsionen dar. Durch eine operative Beseitigung genitaler Prädilektionsorte der HPV-Infektion (Präputium) können zumindest die häufiger mit HPV-High-risk-Typen assoziierten subklinischen Läsionen offensichtlich eingedämmt werden. Anders lokalisierte Rezidive lassen sich aber nicht verhindern.

Zeitraum des Auftretens von Rezidiven an HPV-Läsionen

Der Zeitraum bis zum Auftreten von Rezidiven nach initialer Lasertherapie lag im Schnitt bei 5,2 Monaten (Median 3 Monate), wobei dieser etwas höher liegt als in der Literatur angegeben [48, 50]. Erst nach 1 Jahr waren ca. 95 % aller

Rezidive manifest geworden. Diesem Umstand muß Rechnung getragen werden, indem regelmäßige Nachuntersuchungen nach Lasertherapie über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr erfolgen sollten, um möglichst viele Rezidive aufzudecken. Dies wurde erst kürzlich von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [74, 92].

Einfluß von Behandlungsanzahl und –dauer auf die Sanierungsrate

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, daß die Sanierungsrate im 4-Jahres Follow-up unabhängig von der Behandlungsanzahl und –dauer ist. Gleiche Feststellung haben Arbeitsgruppen bei Nachbeobachtungszeiträumen von 0,5 Monaten [52], 6,2 Monaten [40] und 24 Monaten [53] gemacht. Ein Patient mit vielen Rezidiven in der Anamnese hat demnach die gleiche Wahrscheinlichkeit, in einem Nachbeobachtungszeitraum wieder Warzen zu haben oder warzenfrei zu sein, wie ein Patient mit wenigen Rezidiven in der Anamnese. Jedoch konnte auch gezeigt werden, daß die Warzenhäufigkeit in beiden Patientengruppen mit fortschreitender Zeit signifikant abnimmt. So gesehen scheint eine Therapie von HPV-Läsionen zwar zu einer momentanen klinischen Erscheinungsfreiheit führen zu können, für die dauerhafte Erscheinungsfreiheit scheint jedoch letztlich das Immunsystem hauptverantwortlich zu sein. Ausgehend von einer ubiquitären HPV-Besiedelung des Genitale kann es demnach solange zu Rezidiven kommen, solange persistierende HPV-Infektionen vom Immunsystem nicht eliminiert oder zumindest kontrolliert werden.

Wertigkeit des Essigsäuretests

Subklinische HPV-Läsionen können mit dem bloßen Auge nicht erkannt werden. Der Wert des Essigsäuretests inklusive Untersuchung des Genitale mit Vergrößerungstechniken (Lupe, Kolposkop) zur Identifizierung von subklinischen HPV-Läsionen wurde in zahlreichen Studien evaluiert [10, 16, 21, 38, 39, 42, 46, 47, 65, 77, 78, 82, 91]. Die nach Markierung mit 3-5 %iger Essigsäure weißlich angefärbten Areale sind allerdings nicht spezifisch für HPV-Infektionen, sondern werden auch durch entzündliche oder traumatische Epithelläsionen verschiedener Art vorgetäuscht [82]. Daher ist es unbedingt erforderlich, anhand charakteristischer Kriterien die HPV-typischen von

unspezifischen, essigweißen Läsionen abzugrenzen. In der Nachuntersuchung konnten wir mittels Essigsäuretest und Lupenvergrößerung bei 8 Patienten eindeutige subklinische Effloreszenzen nachweisen, von denen 7 mittels DNA-Analyse sowie 1 histologisch bestätigt wurden. Eine unspezifische Essigreaktion war bereits in der Wiederholungstestung nicht mehr reproduzierbar.

Da der Essigsäuretest die einzige Möglichkeit darstellt, subklinische HPV-Effloreszenzen einfach klinisch aufzudecken, und er bei Einhaltung strenger Beurteilungskriterien eine gute Spezifität aufweist [75], desweiteren kostengünstig und schmerzlos ist, sollte er grundsätzlich in der HPV-Diagnostik eingesetzt werden. Bei persistierenden unklaren Befunden sowie zunächst ungeübten Untersuchern ist er durch Probebiopsien mit anschließender histologischer/HPV-labortechnischer Untersuchung zu ergänzen.

Insgesamt wurden von uns sowohl in der Initial- als auch studienbedingten Nachbeobachtung vergleichsweise wenige subklinische HPV-Effloreszenzen diagnostiziert. Eine gängige Schätzung, daß subklinische HPV-Läsionen viermal häufiger seien als klinische Effloreszenzen [45], konnten wir demnach nicht bestätigen. Diese Daten wurden allerdings in Querschnittstudien erhoben und beziehen sich auf die Gesamtbevölkerung. Unser Patientengut war hingegen selektioniert, da über die Hälfte der Männer speziell wegen sichtbarer Genitalwarzen unsere STD-Klinik aufgesucht hat. Ferner waren unsere Beurteilungskriterien der Essigsäuretestung offensichtlich sehr spezifisch. Während einige Untersucher Essigsäure-positive subklinische HPV-Effloreszenzen bei HPV-Testungen im Labor nur in 39-56 % bestätigen konnten [76, 38], ergaben sich bei uns keine falsch-positiven Ergebnisse. Die Validität der Essigsäuretestung ist demnach stark Untersucher- und Erfahrungsabhängig [75].

HPV-Prävalenz des Peniskarzinoms

Das histologisch gesicherte Peniskarzinom, das in dieser Studie aufgedeckt wurde, war die einzige nachgewiesene subklinische Läsion, die trotz aufwendiger Laborverfahren HPV-DNA-negativ war. Da die nested-PCR die mit Abstand sensitivste DNA-Nachweismethode ist, die selbst ins Wirtsgenom integrierte HPV-DNA nachweisen kann, scheint die Nachweismethode per se nicht ursächlich zu sein. Vielmehr geht dies mit den Beobachtungen in der

Literatur konform, daß Peniskarzinome nur in 30-80 % HPV-assoziiert sind [74]. Hierin ist ein Unterschied zu dem Zervixkarzinom zu sehen, in dem HPV in 99,7 % nachgewiesen wird [88] und dessen Kausalpathogenese durch HPV damit anerkannt ist [94].

Abhängigkeit von Zirkumzisionsstatus und Lokalisation der HPV-Effloreszenzen

Die Beziehung zwischen Zirkumzisionsstatus und anatomischer Verteilung der HPV-Effloreszenzen in dieser Studie entspricht der von anderen Arbeitsgruppen. So wies Oriel [60] bei zumeist unbeschnittenen Männern Genitalwarzen am häufigsten an Präputium und Frenulum nach, während Chuang et al. [22] bei hauptsächlich zirkumzidierten Männern Kondylome am häufigsten am Penisschaft fand.

Dass bei unserer Nachuntersuchung bei nicht-zirkumzidierten Männern jedoch der Penisschaft etwas häufiger von HPV-Rezidiven betroffen war als das Präputium oder Frenulum, läßt sich möglicherweise durch die sehr geringe entsprechende Patientenzahl erklären. So beruht die Lokalisationsbestimmung bei dieser Patientengruppe nur auf 16 unbeschnittenen Männern und kann damit statistisch nicht so repräsentativ sein wie Untersuchungen mit größeren Fallzahlen, wie bei Chuang et al. (n=246), Oriel (n=191) oder der studieneigenen Initialuntersuchung (n=80).

Abhängigkeit von Zirkumzisionsstatus und Rezidiven an HPV-Läsionen

Interessanterweise wurden in der Gruppe beschnittener Patienten im 4-Jahres Follow-up ebenso viele Männer mit HPV-Rezidiven (15 von 51) beobachtet wie bei den nicht beschnittenen Patienten (16 von 52). Diese Beobachtung wurde auch von anderen Studiengruppen gemacht [24]. Bei näherer Betrachtung unserer Studienpopulation fällt auf, daß subklinische Läsionen bei zirkumzidierten Männern signifikant seltener sind als bei unbeschnittenen Männern. Dies liegt daran, daß durch die Zirkumzision mit dem Präputium der Prädilektionsort der subklinischen Effloreszenzen [84] entfernt wird. Die Condylomata acuminata sind hingegen häufiger am Penisschaft zu finden. Somit läßt sich erklären, daß durch die Zirkumzision zwar die subklinischen Läsionen abnehmen, jedoch am Penisschaft neue Condylomata acuminata

auftreten können und zu der gleichen Rezidivhäufigkeit zwischen beiden Patientengruppen beitragen.

Ferner wurde in der vorliegenden Studie beobachtet, daß Rezidive nach Lasertherapie bei zirkumzidierten Patienten signifikant später auftreten als bei unbeschnittenen Männern. HPV-Effloreszenzen bei beschnittenen Männern finden sich, wie erwähnt, besonders häufig am Penisschaft. Das dortige langsamere Wachstum von Kondylomen erklärt sich möglicherweise durch die stärkere Verhornung des Plattenepithels am Penisschaft im Vergleich zu Präputium und Glans penis.

Abhängigkeit von Zirkumzisionsstatus und Zervixkarzinom-Risiko

Bereits mehrfach wurde berichtet, daß Partnerinnen von zirkumzidierten Männern ein geringeres Risiko zur Entstehung von Zervixkarzinomen haben sollen als Partnerinnen von unbeschnittenen Männern [11, 14, 44]. Erst kürzlich wurde dies in einer internationalen Studie anhand von über 1000 Sexualpartnern bestätigt [20]. Dabei ist wenig bekannt über den Mechanismus, durch den eine Zirkumzision vor der Entstehung von Zervixkarzinomen schützen soll [20]. Unsere Ergebnisse zeigen, daß subklinische Effloreszenzen, die häufig mit High-risk-HPV-Typen assoziiert sind [3], signifikant am häufigsten am Präputium zu finden sind. Die operative Entfernung dieses Prädilektionsortes für High-risk-HPV-Typen ist eine mögliche Erklärung für die geringere Rate an Zervixkarzinomen bei Frauen mit beschnittenen Partnern. Ob eine routinemäßige Zirkumzision die Inzidenz genitaler HPV-Infektionen bzw. des Zervixkarzinoms senkt, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Indikationen zur Behandlung von Condylomata acuminata

Die Indikation zur Behandlung von Condylomata acuminata ist allgemein anerkannt [34, 57, 71, 86, 89]. Wenngleich gelegentlich spontane Remissionen berichtet werden, neigen Genitalwarzen in der Regel zu Vergrößerung und Ausbreitung [51]. Die sich daraus ergebenden kosmetischen Probleme können zu erheblicher psychischer Belastung des Patienten führen [63]. Auch kann es zu funktionellen Problemen wie Blutungen, Probleme beim Wasserlassen und beim Geschlechtsverkehr kommen [36].

Condylomata acuminata gelten als benigne HPV-Effloreszenzen und werden zu >90 % durch die HPV-Typen 6 und 11 verursacht [87]. Jedoch werden in diesen HPV-Läsionen zu einem geringen Prozentsatz auch onkogene HPV-Typen nachgewiesen [51]. Diese in der Literatur beschriebene Typverteilung korreliert mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. So konnten in 27 klinischen Rezidiven insgesamt 29 Low-risk-, jedoch auch 3 High-risk-HPV-Typen nachgewiesen werden.

Da das Peniskarzinom, welches nicht einmal 1 % aller männlichen Karzinome ausmacht [75], eine vergleichsweise seltene Erkrankung ist und mit 30-80 % unregelmäßig HPV-assoziiert erscheint [74], spielt der Nachweis von High-risk-HPV-Typen in Genitalwarzen für den Mann selbst eher eine untergeordnete Bedeutung. Das zweithäufigste Malignom der Frau, das Zervixkarzinom, ist hingegen eindeutig HPV-assoziiert [88]. Die mögliche Assoziation von benigne geltenden Condylomata acuminata mit High-risk-HPV-Typen in ca. 10 % der Fälle bei klinisch belegter leichter sexueller Übertragbarkeit von Genitalwarzen [51] ist somit neben funktionellen und kosmetischen Problemen ein weiterer Grund, diese HPV-Effloreszenzen zu therapieren. Zwar kann damit keine HPV-Sanierung des Genitale erfolgen, jedoch wird damit die hohe Viruslast und damit hohe Infektiösität der Condylomata acuminata beseitigt [81].

Indikationen zur Behandlung subklinischer HPV-Läsionen

Die Indikation zur Behandlung subklinischer HPV-Läsionen wird im Gegensatz zu der von Condylomata acuminata kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen befürworten die Behandlung subklinischer Effloreszenzen aufgrund nachweisbarer, infektionsfähiger Viren, insbesondere der High-risk-Gruppe, sowie des gehäuften Vorkommens intraepithelialer Neoplasien [48, 75, 76]. Andere Autoren sehen keine grundsätzliche Indikation für eine Behandlung subklinischer Effloreszenzen, da dadurch weder der Krankheitsverlauf beeinflusst noch die Prognose des Sexualpartners geändert werden soll [56, 66].

In der vorliegenden Studie wurden in 8 subklinischen Läsionen 6 Low-risk- sowie 2 High-risk-HPV-Typen nachgewiesen. Ferner ergab die histologische Untersuchung einer subklinischen Läsion ein oberflächliches Peniskarzinom ohne Nachweis von HPV-DNA. Somit konnte in 3 von 8 (37,5 %) subklinischen

Effloreszenzen High-risk-HPV-Typen oder gar histologische Zeichen der Malignität ermittelt werden. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen von Barrasso et al. [3], wonach Condylomata acuminata größtenteils mit Low-risk-, subklinische Effloreszenzen hingegen häufig mit High-risk-HPV-Typen assoziiert seien und intraepitheliale Neoplasien enthalten können. Zwar ist die Viruslast subklinischer Läsionen geringer als die von Condylomata acuminata [51], jedoch sind auch diese HPV-Effloreszenzen als infektiös anzusehen [75]. Diese Umstände sprechen für die Gefährlichkeit subklinischer Effloreszenzen und legen nahe, diese Läsionen zur Vermeidung progredienter Epitheldysplasien zu behandeln, wie es von einigen Autoren gefordert wird.

Zieht man in Betracht, daß eine Partnerinfektion vor der ärztlichen Diagnose einer HPV-Erkrankung stattfindet, so werden die Ergebnisse von Arbeitsgruppen verständlich, daß durch Behandlung weder Krankheitsverlauf noch Prognose des Sexualpartners beeinflußt werden [49, 56, 66], da latente Infektionen als Reservoir für neue subklinische und klinische HPV-Effloreszenzen fungieren können und nur das Immunsystem für eine dauerhafte Kontrolle von HPV-Infektionen ausschlaggebend ist. In einer intakten Partnerschaft ist somit das primäre Ziel der Behandlung die Verhinderung von progredienten Epitheldysplasien. Die Behandlung und regelmäßige Nachuntersuchung über mindestens 1 Jahr dürfte allerdings die Infektionsrate von neuen Sexualpartnern vermindern [51].

HPV-Typspektrum im Genitoanalbereich

Bisherige Studien über HPV-Typspektren im Genitoanalbereich waren aufgrund der verwendeten Nachweismethoden limitiert. Gängige Verfahren zum HPV-Nachweis sind In-Situ-Hybridisierung, Southern Blot-Hybridisierung, Hybrid Capture Assay und die deutlich sensitivere PCR. Die Identifizierung erfolgt dabei entweder gruppenspezifisch, so daß beispielsweise High-risk von Low-risk HPV-Typen ohne nähere Differenzierung unterschieden werden. Für wissenschaftliche epidemiologische Fragestellungen ist jedoch zusätzlich die Identifizierung der HPV-Genotypen von Interesse, die bisher hauptsächlich durch Hybridisierung mit typspezifischen Sonden oder Sequenzierung erfolgte. Dabei war die Anzahl der nachgewiesenen Genotypen durch die Anzahl der verwendeten Sonden oder die Sequenzierung einzelner HPV-Typen begrenzt.

Folglich beruhen bislang Angaben über Typspektren auf Studien mit limitiertem Typennachweis oder Einzelfallbeschreibungen. Mit Hilfe des in der vorliegenden Studie verwendeten Verfahrens der PCR mit RFLP-Analyse und Hybridisierung mit generischen HPV-Sonden war es möglich, nahezu alle heute bekannten HPV-Genotypen zu identifizieren. Damit konnte erstmals das HPV-Typspektrum im Genitoanalbereich in einem Patientenkollektiv anhand repräsentativer Probenbiopsien untersucht werden.

Wie aus dieser Studie hervorgeht, kann aufgrund des klinischen Aussehens der HPV-Effloreszenz nicht auf den zugrundeliegenden HPV-Typ geschlossen werden. Sowohl klinische als auch subklinische HPV-Effloreszenzen werden durch eine Vielzahl von HPV-Typen hervorgerufen. Allerdings überwogen bei Condylomata acuminata, wie in Tabelle 9 ersichtlich, bei weitem die benignen HPV-Typen, während bei subklinischen Effloreszenzen High-risk-Typen oder histologische Zeichen der Malignität in 37,5 % nachweisbar waren.

Insgesamt wurden überdurchschnittlich häufig Low-risk-HPV-Typen nachgewiesen. Dies ist bedingt durch das deutliche Überwiegen an Condylomata acuminata im Ausgangsbefund vor Lasertherapie sowie unter den Rezidiven. Wie bereits aufgeführt, ergibt sich der hohe Anteil an Kondylomen aufgrund des selektionierten Patientengutes in unserer HPV-Spezialsprechstunde.

Neben den für den Genitoanalbereich typischen mukosaassoziierten HPV-Genotypen wurde auch eine Reihe als kutan geltende, Epidermodysplasia verruciformis (EV) assoziierte HPV-Typen [33, 35, 61] in den Probenbiopsien festgestellt. Bislang wurden EV HPV in malignen und benignen Läsionen der äußeren Haut [13] als auch klinisch unauffälliger Haut [1] bei EV-Patienten, Transplantatempfängern sowie immunkompetenten Personen festgestellt. Der jetzige Nachweis der kutanen EV HPV-Typen 5, 9, 14, 17, 19, 20 und 36 im Genitoanalbereich bei durchwegs immunkompetenten Patienten macht deutlich, daß EV HPV offensichtlich nicht auf die äußere Haut beschränkt bleiben. Vielmehr scheint es sich um HPV-Typen zu handeln, die ubiquitär Plattenepithelien infizieren, unabhängig vom Immunstatus der betroffenen Personen. Die meisten nachgewiesenen EV HPV lagen als latente Infektionen vor, in zwei Fällen wurden sie in einem Condyloma acuminatum festgestellt. Dabei ist die Bedeutung des EV HPV 9 als alleinig nachgewiesenes HPV in

einem Condyloma acuminatum unklar. Die Möglichkeit, daß HPV 9 nicht für die Proliferation verantwortlich war, sondern das Kondylom durch einen nicht nachgewiesenen genitalen HPV-Typ induziert wurde, erscheint eher unwahrscheinlich. In diesem Fall lägen von dem genitalen HPV-Typ eine ausreichend große Menge an Kopien vor, so daß das von uns verwendete äußerst sensitive Nachweisverfahren das genitale HPV sicher aufgedeckt hätte. Möglicherweise können EV HPV auch genitale Kondylome induzieren, sie wurden bislang nur noch nie darin nachgewiesen, weil frühere Studien keine Primer zur Diagnostik von EV HPV im Genitale verwendet haben. Nicht auszuschließen ist auch, daß das von uns diagnostizierte Condyloma acuminatum eher eine Verruca vulgaris oder papulöse Läsion war, bei denen an der äußeren Haut der Nachweis von EV HPV beschrieben wurde [54]. Anders als bei mukosaassoziierten High-risk-HPV-Typen, wie beispielsweise HPV 16 und 18, deren Kausalzusammenhang mit der Entstehung insbesondere des Zervixkarzinoms anerkannt ist [88], ist eine kausale Rolle von EV HPV für die Entstehung von kutanen nicht-Melanom-Karzinomen unklar [54]. Zur Evaluation der Bedeutung von EV HPV im Genitoanalbereich bedarf es weiterer epidemiologischer Untersuchungen. Hierfür sind äußerst sensitive Nachweismethoden mit nested-PCR-Technik erforderlich, die neben genitalen auch kutane EV HPV aufdecken, wie beispielsweise die von Berkhout et al. [6] entwickelten degenerierten Konsensus-Primer.

HPV-Typisierungen spielen jedoch in der urologischen Routineuntersuchung aufgrund bislang unklarer prognostischer Bedeutung und fehlender therapeutischer Konsequenzen derzeit keine Rolle, sondern bleiben Studien und Forschung vorbehalten [75]. In der gynäkologischen Praxis könnten HPV-Typisierungen, ergänzend zur Zytologie, in bestimmten Fällen wie beispielsweise bei Frauen mit erhöhtem Zervixkarzinom-Risiko, durchaus hilfreich für die Festlegung des individuellen weiteren Vorgehens sein, jedoch muß dies durch weitere Studien evaluiert werden [74].

HPV-Partnerinfektion

Im Zeitraum der retrospektiven Datenerhebung wurden 96 Partnerinnen der 103 Männer primär oder sekundär gynäkologisch auf HPV-Infektionen untersucht. Dabei wurde bei 62 Partnerinnen eine klinische und/oder subklinische HPV-

Infektion festgestellt, wodurch sich eine Partnerinfektionsrate von 64,6 % ergibt. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Angaben der Literatur überein, wonach die Partnerinfektionsrate bei durchschnittlich 70 % liegt [9, 29, 48, 58], und zeigt deutlich die hohe Infektiösität der HPV.

Interessanterweise wurden in den veröffentlichten Arbeiten HPV-Partneruntersuchungen bislang nahezu ausschließlich ausgehend vom Befund der Frauen an Männern durchgeführt. Zum einen ist dieser Umstand vermutlich in der bedeutend höheren malignen Entartungsrate genitaler HPV-Infektionen bei Frauen als bei Männern begründet. Hieraus resultieren die öffentlich empfohlenen regelmäßigen Zervixkarzinom-Vorsorgeuntersuchungen, die es für das Genitale des Mannes bislang nicht gibt. Dadurch werden HPV-Infektionen, insbesondere subklinische HPV-Effloreszenzen und kleine Kondylome, häufig zuerst bei Frauen diagnostiziert und eine entsprechende Untersuchung des männlichen Partners eingeleitet. Zum anderen läßt die geringe, vom Befund des Mannes ausgehende Partneruntersuchungsrate auf ein noch nicht allgemein herrschendes Bewußtsein über die mögliche onkogene Potenz der HPV-Infektionen unter den die Männer behandelnden Ärzten schließen. Bei sexueller Übertragbarkeit dieser Viren erscheint jedoch zur Krebsprävention eine routinemäßige Untersuchung der Partnerinnen erkrankter Männer berechtigt. Die Rolle des HPV-infizierten Mannes als Risikofaktor bei der Entstehung von Zervixdysplasien wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben [9, 11, 19, 43, 44, 76].

5 Zusammenfassung

Die Lasertherapie ist eine etablierte Methode zur Behandlung klinischer und subklinischer HPV-Effloreszenzen im Genitoanalbereich. Es wird hierbei über teilweise sehr unterschiedliche Behandlungserfolge berichtet, was zum Teil auf unterschiedliche Durchführungsmodalitäten innerhalb der Studien als auch Bewertungskriterien für den Therapieerfolg zurückzuführen ist. Verlaufsbeobachtungen nach Laserbehandlung wurden bislang einzig unter klinischen und histopathologischen Gesichtspunkten durchgeführt. Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, bei aussagekräftigem Kontrollintervall nach Nd:YAG-Lasertherapie von HPV-Läsionen des Genitale, die klinische und erstmals auch virale HPV-Sanierung zu untersuchen.

Nach retrospektiver Datenerhebung von lasertherapierten urologischen Patienten erfolgte bei medianem Follow-up von 4 Jahren eine prospektive Kontrolluntersuchung von 103 Patienten zur Ermittlung der klinischen und labortechnisch feststellbaren viralen Clearance. Dabei ließ die Inspektion einschließlich Essigsäuremarkierung und Lupenvergrößerung klinische und/oder subklinische Rezidive in 30,1 % der Fälle erkennen. Mit labortechnischen Methoden konnten bei weiteren 15,5 % klinisch unauffälliger Männer persistierende HPV-Infektionen im Laserbehandlungsbereich bzw. unmittelbar angrenzend nachgewiesen werden. Damit fand sich eine vollständige Clearance in 54,4 % der Patienten. Bemerkenswerterweise fanden sich klinische und subklinische Rezidive nur außerhalb der Behandlungsgebiete. Somit erscheint die Lasertherapie sehr effektiv in der lokalen Sanierung dieser HPV-Effloreszenzen. Eine Induktion körpereigener Immunität gegen HPV mit dem Erfolg kompletter Viruselimination bzw. Verhinderung klinischer oder subklinischer Rezidive tritt nicht ein.

Bei erster systematischer HPV-Genotypenanalyse an einem urologischen Patientenkollektiv konnten mit sensitivster Labortechnik eine bislang unbekannte HPV-Typenvielfalt und erstmalig auch Epidermodysplasia verruciformis-assoziierte Typen im Genitale nachgewiesen werden. Der Essigsäuretest zur Diagnostik subklinischer HPV-Effloreszenzen weist unter Berücksichtigung strenger Beurteilungskriterien eine gute Spezifität auf. Er sollte daher in der

HPV-Diagnostik erfahrener Ärzte routinemäßig angewendet werden, um die gehäuft High-risk-HPV-Typen enthaltenden subklinischen HPV-Effloreszenzen aufzudecken und einer anschließenden Therapie zuzuführen. Zirkumzidierte Männer wiesen signifikant weniger HPV-High-risk-Typen und subklinische HPV-Läsionen auf, weil im Gegensatz zu Unbeschnittenen mit dem Präputium ein Prädilektionsort für diese HPV-Läsionen entfernt wurde. Die hohe Infektiösität klinischer und subklinischer HPV-Läsionen konnte in dieser Studie anhand einer Partnerinfektionsrate von 64,6 % bekräftigt werden.

Die Nd:YAG-Lasertherapie stellt ein probates Mittel zur lokalen Sanierung klinischer und subklinischer HPV-Läsionen dar. Sie vermag aber nicht, das Wiederauftreten von Rezidiven zu verhindern. Diese beruhen vermutlich auf den ubiquitären, latenten HPV-Infektionen des Anogenitale. Für eine dauerhafte Erscheinungsfreiheit der HPV-Infektionen scheint letztlich das körpereigene Immunsystem von größerer Bedeutung zu sein als die lokale chirurgische Therapie.

6 Literaturverzeichnis

1. Astori G, Lavergne D, Benton C, Hockmayr B, Egawa K, Garbe C, de Villiers EM. Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *J Invest Dermatol.* 1998; 110:752-5
2. Baggish MS. Carbon dioxide laser treatment for condylomata acuminata venereal infections. *Obstet Gynecol.* 1980; 55:711-5
3. Barrasso R, De Brux J, Croissant O, Orth G. High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med.* 1987; 317:916-23
4. Becker TM, Stone KM, Alexander ER. Genital human papillomavirus infection. A growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1987; 14:389-96
5. Bellina JH. The use of the carbon dioxide laser in the management of condyloma acuminatum with eight-year follow-up. *Am J Obstet Gynecol.* 1983; 147:375-8
6. Berkhout RJ, Tieben LM, Smits HL, Bavinck JN, Vermeer BJ, ter Schegget J. Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:690-5
7. Beutner KR, Tying S. Human papillomavirus and human disease. *Am J Med.* 1997; 102:9-15
8. Beutner KR, Ferenczy A. Therapeutic approaches to genital warts. *Am J Med.* 1997; 102:28-37
9. Bleeker MC, Hogewoning CJ, Van Den Brule AJ, Voorhorst FJ, Van Andel RE, Risse EK, Starink TM, Meijer CJ. Penile lesions and human papillomavirus in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47:351-7
10. Boon ME, Schneider A, Hogewoning CJ, van der Kwast TH, Bolhuis P, Kok LP. Penile studies and heterosexual partners. Peniscopy, cytology, histology and immunocytochemistry. *Cancer.* 1988; 61:1652-9
11. Boon ME, Susanti I, Tasche MJ, Kok LP. Human papillomavirus (HPV)-associated male and female genital carcinomas in a Hindi population. The male as vector and victim. *Cancer.* 1989; 64:559-65
12. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in

- cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87:796-802
13. Boxman IL, Russell A, Mulder LH, Bavinck JN, Schegget JT, Green A. Case-control study in a subtropical Australian population to assess the relation between non-melanoma skin cancer and epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs. The Nambour Skin Cancer Prevention Study Group. *Int J Cancer.* 2000;86:118-21
 14. Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, Gaitan E, Tenorio F, de Britton RC, Garcia M, Rawls WE. The male factor in the etiology of cervical cancer among sexually monogamous women. *Int J Cancer.* 1989; 44:199-203
 15. Calkins JW, Masterson BJ, Magrina JF, Capen CV. Management of condylomata acuminata with the carbon dioxide laser. *Obstet Gynecol.* 1982; 59:105-8
 16. Carpiello V, Sedlacek TV, Cunnane M, Schlecker B, Malloy T, Wein AJ. Magnified penile surface scanning in diagnosis of penile condyloma. *Urology.* 1986; 28:190-2
 17. Carpiello VL, Zderic SA, Malloy TR, Sedlacek T. Carbon dioxide laser therapy of subclinical condyloma found by magnified penile surface scanning. *Urology.* 1987; 29:608-10
 18. Carpiello VL, Schoenberg M. Laser treatment of condyloma and other external genital lesions. *Semin Urol.* 1991; 9:175-9
 19. Castellsague X, Ghaffari A, Daniel RW, Bosch FX, Munoz N, Shah KV. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *J Infect Dis.* 1997; 176:353-61
 20. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S, Eluf-Neto J, Ngelangel CA, Chichareon S, Smith JS, Herrero R, Moreno V, Franceschi S. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med.* 2002; 346:1105-12
 21. Chow VT, Tay SK, Tham KM, Lim-Tan SK, Bernard HU. Subclinical human papillomavirus infection of the male lower genital tract: colposcopy, histology and DNA analysis. *Int J STD AIDS.* 1991; 2:41-5
 22. Chuang TY, Perry HO, Kurland LT, Ilstrup DM. Condyloma acuminatum in Rochester, Minn, 1950-1978. I. Epidemiology and clinical features. *Arch Dermatol.* 1984; 120:469-75
 23. Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, Taylor-Robinson D, Stanley MA. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol.* 1994; 102:768-74

24. Cook LS, Koutsky LA, Holmes KK. Clinical presentation of genital warts among circumcised and uncircumcised heterosexual men attending an urban STD clinic. *Genitourin Med.* 1992; 69:262-4
25. Cuiffo G. Investo posito con filtrato di verruce vulgare. *Giornale italiano delle malattie veneree.* 1907; 48:12-7
26. Ferenczy A. Laser therapy of genital condylomata acuminata. *Obstet Gynecol.* 1984; 63:703-7
27. Ferenczy A. Comparison of 5-fluorouracil and CO2 laser for treatment of vaginal condylomata. *Obstet Gynecol.* 1984; 64:773-8
28. Ferenczy A, Mitao M, Nagai N, Silverstein SJ, Crum CP. Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N Engl J Med.* 1985; 313:784-8
29. Ferenczy A. Laser treatment of genital human papillomavirus infections in the male patient. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1991; 18:525-35
30. Ferenczy A. Epidemiology and clinical pathophysiology of condylomata acuminata. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172:1331-9
31. Gissmann L, zur Hausen H. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73:1310-3
32. Gross G, Pfister H, Seidl S, Stegner HE (Hrsg.). Genitale Infektionen durch Papillomviren. München, Bern, Wien, New York: *Zuckschwerdt*, 1992
33. Gross G, Barrasso R (eds.). Human papilloma virus infection: a clinical atlas. Berlin, Wiesbaden: *Ullstein Mosby*, 1997.
34. Gross G. Condylomata acuminata und andere HPV-assoziierte Krankheitsbilder des Genitale und der Harnröhre. Leitlinie der Deutschen STD-Gesellschaft (DSTDG). *Hautarzt.* 2001; 52:405-10
35. Grußendorf-Conen EI, Schwarz E. Viruswarzen an Haut und Schleimhaut: Erreger, Klinik, Therapie. Berlin, Wien: *Blackwell Wissenschafts-Verlag*, 1995
36. Handsfield HH. Clinical presentation and natural course of anogenital warts. *Am J Med.* 1997; 102:16-20
37. Heimbach D, Brühl P. Aktuelle Diagnostik und Therapie bei Condylomata acuminata. *Akt Dermatol.* 1995; 21:196-201
38. Hippelainen M, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjänen S, Syrjänen K. Genital human papillomavirus lesions of the male sexual partners: the diagnostic accuracy of peniscopy. *Genitourin Med.* 1991; 67:291-6

39. Hippelainen MI, Syrjänen S, Hippelainen MJ, Saarikoski S, Syrjänen K. Diagnosis of genital human papillomavirus (HPV) lesions in the male: correlation of peniscopy, histology and in situ hybridisation. *Genitourin Med.* 1993; 69:346-51
40. Hippelainen MI, Hippelainen M, Saarikoski S, Syrjänen K. Clinical course and prognostic factors of human papillomavirus infections in men. *Sex Transm Dis.* 1994; 21:272-9
41. Hofstetter A (Hrsg.). *Laser in der Urologie. Eine Operationslehre.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1995
42. Jonsson M, Karlsson R, Evander M, Gustavsson A, Rylander E, Wadell G. Acetowhitening of the cervix and vulva as a predictor of subclinical human papillomavirus infection: sensitivity and specificity in a population-based study. *Obstet Gynecol.* 1997; 90:744-7
43. Kataja V, Syrjänen S, Yliskoski M, Hippelinen M, Vayrynen M, Saarikoski S, Mantyjärvi R, Jokela V, Salonen JT, Syrjänen K. Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case-control study. *Am J Epidemiol.* 1993; 138:735-45.
44. Kjaer SK, de Villiers EM, Dahl C, Engholm G, Bock JE, Vestergaard BF, Lynge E, Jensen OM. Case-control study of risk factors for cervical neoplasia in Denmark. I: Role of the "male factor" in women with one lifetime sexual partner. *Int J Cancer.* 1991; 48:39-44
45. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997; 102:3-8
46. Krebs HB, Schneider V. Human papillomavirus-associated lesions of the penis: colposcopy, cytology and histology. *Obstet Gynecol.* 1987; 70:299-304
47. Krebs HB. Genital HPV infections in men. *Clin Obstet Gynecol.* 1989; 32:180-90
48. Krebs HB. Management of human papillomavirus-associated genital lesions in men. *Obstet Gynecol.* 1989; 73:312-6
49. Krebs HB, Helmkamp BF. Treatment failure of genital condylomata acuminata in women: role of the male sexual partner. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165:337-9
50. Krogh J, Beuke HP, Miskowiak J, Honnes de Lichtenberg M, Nielsen OS. Long-term results of carbon dioxide laser treatment of meatal condylomata acuminata. *Br J Urol.* 1990; 65:621-3
51. Lacey CJ, Fairley I. Medical therapy of genital human papilloma virus-related disease. *Int J STD AIDS.* 1995; 6:399-407

52. Larsen J, Petersen CS. The patient with refractory genital warts in the STD-clinic. Treatment failure with CO₂-laser. *Dan Med Bull.* 1990; 37:194-5
53. Lassus J, Happonen HP, Niemi KM, Ranki A. Carbon dioxide (CO₂)-laser therapy cures macroscopic lesions, but viral genome is not eradicated in men with therapy-resistant HPV infection. *Sex Transm Dis.* 1994; 21:297-302
54. Majewski S, Jablonska S. Do epidermodysplasia verruciformis human papillomaviruses contribute to malignant and benign epidermal proliferations? *Arch Dermatol.* 2002; 138:649-54
55. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells.* 1989; 7:209-14
56. Maw RD. Treatment of anogenital warts. *Dermatol Clin.* 1998; 16:829-34
57. Maw RD. National guideline for the management of anogenital warts. Clinical Effectiveness Group (Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases). *Sex Transm Infect.* 1999; 75 (suppl 1):S71-5
58. Maymon R, Shulman A, Maymon B, Bekerman A, Werchow M, Faktor JH, Altaras M. Penile condylomata: a gynecological epidemic disease: a review of the current approach and management aspects. *Obstet Gynecol Surv.* 1994; 49:790-800
59. Nindl I, Jacobs M, Walboomers JM, Meijer CJ, Pfister H, Wieland U, Meyer T, Stockfleth E, Klaes R, von Knebel, Doeberitz M, Schneider A, Duerst M. Interlaboratory agreement of different human papillomavirus DNA detection and typing assays in cervical scrapes. *Int J Cancer.* 1999; 81:666-8
60. Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis.* 1971; 47:1-13
61. Phelps WC, Alexander KA. Antiviral therapy for human papillomaviruses: rationale and prospects. *Ann Intern Med.* 1995; 123:368-82
62. Reid R, Greenberg M, Jenson AB, Husain M, Willett J, Daoud J, Temple G, Stanhope CR, Sherman AI, Phibbs GD, et al. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol.* 1987; 156:212-22
63. Reitano M. Counseling patients with anogenital warts. *Am J Med.* 1997; 102:38-43
64. Riva JM, Sedlacek TV, Cunnane MF, Mangan CE. Extended carbon dioxide laser vaporization in the treatment of subclinical papillomavirus infection of the lower genital tract. *Obstet Gynecol.* 1989; 73:25-30

65. Rosenberg SK, Reid R. Sexually transmitted papillomaviral infections in the male: I. Anatomic distribution and clinical features. *Urology*. 1987; 29:488-92
66. Russomano F, Reis A, de Camargo MJ, Dutra MV, Fonseca SC, Anderson J. Efficacy in treatment of subclinical cervical HPV infection without intraepithelial neoplasia: systematic review. *Sao Paulo Med J*. 2000; 118:109-15
67. Rymark P, Forslund O, Hansson BG, Lindholm K. Genital HPV infection not a local but a regional infection: experience from a female teenage group. *Genitourin Med*. 1993; 69:18-22
68. Sakkas G, Karagiannis A, Karayannis D, Dimopoulos K. Laser treatment in urology: our experience with neodymium:YAG and carbon dioxide lasers. *Int Urol Nephrol*. 1995; 27:405-12
69. Savoca S, Nardo LG, Rosano TF, D'Agosta S, Nardo F. CO₂ laser vaporisation as primary therapy for human papillomavirus lesions. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001; 80:1121-4
70. Schneede P, Muschter R. Laseranwendung bei Condylomata acuminata. *Urologe A*. 1994; 33:299-302
71. Schneede P, Hofstetter A. Diagnostik und Therapie von Genitalerkrankungen durch Humane Papillomviren (HPV). Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU). *Urologe A*. 2001; 40:511-20
72. Schneede P, Münch P, Ziller F, Hofstetter A. Harnröhrencondylome. Eine therapeutische Herausforderung. *Hautarzt*. 2001; 52:411-7
73. Schneede P, Meyer T, Ziller F, Stockfleth E, Arndt R, Hofstetter A. Clinical and viral clearance of human papillomavirus (HPV)-associated genital lesions by Nd:YAG-laser treatment. *Med Laser Appl*. 2001; 16:38-42.
74. Schneede P. Genital human papillomavirus infections. *Curr Opin Urol*. 2002; 12:57-61
75. Schneede P, Hillemanns P, Hofstetter A. Humane Papillomviren (HPV) in der Urologie. Teil I: 10-Jahres-Ergebnisse interdisziplinärer HPV-Diagnostik. *Urologe A*. 2002; 41:26-31
76. Schneider A, Kirchmayr R, de Villiers EM, Gissmann L. Subclinical human papillomavirus infections in male sexual partners of female carriers. *J Urol*. 1988; 140:1431-4
77. Schultz RE, Miller JW, MacDonald GR, Auman JR, Peterson NR, Ward BE, Crum CP. Clinical and molecular evaluation of acetowhite genital lesions in men. *J Urol*. 1990; 143:920-3

78. Sedlacek TV, Cunnane M, Carpiello V. Colposcopy in the diagnosis of penile condyloma. *Am J Obstet Gynecol.* 1986; 154:494-6
79. Staehler G, Chaussy C, Jocham D, Schmiedt E. The use of neodymium-YAG lasers in urology: indications, technique and critical assessment. *J Urol.* 1985; 134:1155-60
80. Stanley MA. Virus-keratinocyte interactions in the infectious cycle. In: Stern PL, Stanley MA, eds. *Human Papillomavirus and Cervical Cancer – Biology and Immunology.* Oxford University Press, Oxford. 1994; 116-31
81. Stone KM. Human papillomavirus infection and genital warts: update on epidemiology and treatment. *Clin Infect Dis.* 1995; 20 Suppl 1:S91-7
82. Strand A, Rylander E. Human papillomavirus. Subclinical and atypical manifestations. *Dermatol Clin.* 1998; 16:817-22
83. Strauss M, Bunting MD, Melnick JL. Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas. *J Invest Dermatol.* 1950; 15:433-44
84. Syrjänen SM, von Krogh G, Syrjänen KJ. Detection of human papillomavirus DNA in anogenital condylomata in men using in situ DNA hybridisation applied to paraffin sections. *Genitourin Med.* 1987; 63:32-9
85. van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol.* 1992; 73:2653-60
86. von Krogh G, Lacey CJ, Gross G, Barrasso R, Schneider A. European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex Transm Infect.* 2000; 76:162-8
87. von Krogh G. Management of anogenital warts (condylomata acuminata). *Eur J Dermatol.* 2001; 11:598-603
88. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189:1-3
89. Weissenbacher ER, Schneider A, Gissmann L, Gross G, Heinrich J, Hillemanns P, Link M, Petry U, Schneede P, Spitzbart H. Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion des weiblichen Genitale. *Eur J Infect Immunol Dis Obstet Gynecol.* 2001; 4/5:5-12
90. World Health Organisation. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: human papillomaviruses. Lyon, France: IARC. 1995; 64:277-82

91. Wilkström A, Hedblad MA, Johansson B, Kalantari M, Syrjänen S, Lindberg M, von Krogh G. The acetic acid test in evaluation of subclinical genital papillomavirus infection: A comparative study on peniscopy, histopathology, virology and scanning electron microscopy findings. *Genitourin Med.* 1992; 68:90-9
92. Wilkström A, Popescu C, Forslund O. Asymptomatic penile HPV infection: a prospective study. *Int J STD AIDS.* 2000; 11:80-4
93. zur Hausen H, Meinhof W, Schreiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridisation with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974; 13:650-6
94. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92:690-8

7 Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
CO ₂	Kohlendioxid
cw	Continuous wave
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EV	Epidermodysplasia verruciformis
GOP	generic oligonucleotide probe
HCl	Hydrogenchlorid
HPV	Humanes Papillomvirus
KCl	Kaliumchlorid
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
M	molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
n	Anzahl
NaCitrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazolium
Nd:YAG	Neodymium:Yttrium-Aluminium-Granat
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Standard saline citrate
STD	Sexual transmitted disease
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. A. Hofstetter (Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik München-Großhadern) danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. P. Schneede (Urologische Klinik und Poliklinik München-Großhadern) für seine hervorragende Betreuung. Seine fachliche Kompetenz, seine enorme Hilfsbereitschaft und sein unermüdlicher Einsatz waren für das Gelingen der Dissertation maßgeblich.

Frau B. Ganzmann danke ich für die logistische Unterstützung bei Probengewinnung und -versand.

Weiterhin danke ich besonders Herrn Prof. Dr. R. Arndt, Frau Dr. Keeser und Herrn Dr. T. Meyer (Institut für Immunologie, Pathologie und Molekularbiologie, Hamburg), ohne deren Kooperation und Forschungsinteresse die einmalige HPV-Typenvielfalt im urologischen Fachgebiet nicht hätte aufgedeckt werden können.

Frau I. Raasch danke ich für die Unterweisungen in die Arbeitstechniken des HPV-Nachweises.

Herrn Dipl.-Ing. (FH) H. Stepp möchte ich meinen Dank für seinen stets hilfsbereiten Rat bei der Auswertung des Datenmaterials aussprechen.

Frau H. Foellmer danke ich für das Korrekturlesen.

Vielen herzlichen Dank meinen Eltern, die mir neben der Ermöglichung des Medizinstudiums auch moralisch in schwierigen Phasen der Dissertation stets eine Unterstützung waren. Ferner danke ich meinen Geschwistern, die mir in EDV-Fragen kompetent zur Seite standen.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Fabian Ziller
Geburt 11.11.1972 in München
Staatsangehörigkeit Deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

07/92 Abitur, München

Wehrdienst

10/92-09/93 Sanitätsdienst, München und Hamm

Studium

11/93-05/01 Humanmedizin an der LMU München

Ärztliche Prüfungen

09/95 Ärztliche Vorprüfung
08/97 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/99 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/01 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

03/96-04/96 Chirurgie / Krankenhaus Schwabing, München
04/97 Innere Medizin / Klinik Dr. Decker, München
09/97-10/97 Gynäkologie / University of Bombay, Indien
04/98 Dermatologie / Praxis Dr. Rüther, Kiel
04/99 Urologie / Klinikum Großhadern, München

Praktisches Jahr

10/99-02/00 Chirurgie / Krankenhaus Schwabing, München
02/00-04/00 Kardiologie / University of Birmingham, England
04/00-05/00 Innere Medizin / Krankenhaus Neuperlach, München
05/00-08/00 Dermatologie / Krankenhaus Schwabing, München

Arzt im Praktikum

08/01-01/03 Klinik für Dermatologie und Venerologie am Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin

Assistenzarzt

seit 02/03 Klinik für Dermatologie und Venerologie am Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin

Berlin, den 30.04.2003

10 Anhang

- Ethikvotum
- Patientenmerkblatt für Studienteilnehmer
- Einverständniserklärung

**ETHIKKOMMISSION DES
FACHBEREICHS MEDIZIN**

Goethestraße 70
80336 München

Prof. Dr. med. dent. Dr. h.c. Wolfgang Gernet

Direktor der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Tel.: 0 89/51 60-3244

Fax: 0 89/51 60-4782

13.06.99

Prof. Ger/Fr

Herrn

Dr. P. Schneede

OA der Urologischen Klinik und Poliklinik

Klinikum Großhadern

81366 München

Projekt Nr. 92/99

Untersuchungen von Expositionsrisiken und Sanierbarkeit der Infektionen mit Humanen Papillomviren (HPV) im urologischen Fachgebiet

Sehr geehrter Herr Kollege Schneede,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 1.6.99 und die äußerst korrekt nach den Empfehlungen der EK geänderte Patienteninformation und Einverständniserklärung. Die klare Kennzeichnung der geänderten Passagen hat die Bearbeitung dabei wesentlich erleichtert.

Die von der EK erbetenen Unterlagen sind somit vollständig, so daß nochmals abschließend der o. g. Studie die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit bestätigt werden kann.

Ich wünsche dem weiteren Verlauf Ihrer Studie viel Erfolg und verbleibe

mit freundlichen Grüßen, auch an Ihren verehrten Chef, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. Hofstetter


Prof. Dr. Dr. h.c. W. Gernet
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Patientenmerkblatt für Studienteilnehmer

Untersuchungen zum Nachweis von Infektionen durch Humane Papillomviren(HPV)

Sehr verehrter Patient,

mit diesem Informationsblatt möchten wir Sie kurz über den Hintergrund der bei Ihnen im Rahmen freiwilliger Studien geplanten Untersuchungen zum HPV-Nachweis informieren. Bei Ihnen bzw. Ihrem Sexualpartner bestehen oder bestanden Infektionen mit Humanen Papillomviren. Diese Infektionen können sexuell übertragen werden, so daß in der Regel beide Partner untersucht werden müssen.

Humane Papillomviren infizieren als reine Hautviren in der Regel ausschließlich die Haut und Schleimhäute des Körpers und befallen weder innere Organe noch das Blutssystem. Anders als bei anderen Viruskrankheiten (z.B. AIDS) führen HPV-Infektionen nicht zur Abwehrschwäche des Körpers, können aber bei bestehender Abwehrschwäche leichter Hautveränderungen erzeugen. Die Übertragung von HPV erfolgt in den meisten Fällen durch direkten Körperkontakt, ist allerdings auch auf anderem Weg (z.B. über Handtücher) möglich. Während einige HPV-Typen regelmäßig zu Warzen an Händen und Füßen führen, befallen andere bevorzugt das Genitale und den Enddarm. Von diesen Virustypen kommen wiederum einige ausschließlich in gutartigen Hautveränderungen, andere aber auch in Krebsvorstufen und Tumoren (Karzinomen) des Genitale vor. Man spricht deshalb von Risikotypen der HPV-Infektionen.

Untersuchungen zum Nachweis von HPV-Infektionen dienen damit nicht nur der Beseitigung kosmetisch störender Hautveränderungen, sondern insbesondere auch zur Krebsvorsorge bei Ihnen und Ihrem Partner.

Dabei ist das Erkennen der HPV-Infektionen nur bei einem kleinen Teil der Infektionen sehr einfach möglich. Diese klinischen HPV-Infektionen haben Sie als Patient eventuell bereits selbst in Form von Genitalwarzen bemerkt. Andere HPV-Infektionen führen im Haut- und Schleimhautniveau zu kaum erkennbaren, flachen Veränderungen, die vom Patienten, aber auch weniger spezialisierten Ärzten, leicht übersehen werden können. Diese sogenannten subklinischen HPV-Infektionen müssen mit speziellen, schmerzfreien Testverfahren (z.B. Essigsäuremarkierung) erst deutlicher sichtbar gemacht werden. Als latente HPV-Infektionen schließlich bezeichnet man diejenigen HPV-Infektionen, die weder mit klinischen Testverfahren noch im Mikroskop sichtbar werden. Bei diesen Infektionen befinden sich die Humanen Papillomviren in der Tiefe der gesund erscheinenden Haut. Allein durch kleine Hautproben,



die in Lokalbetäubung völlig schmerzfrei gewonnen werden können, lassen sich in sehr aufwendigen Laborverfahren die latenten HPV-Infektionen sicher nachweisen bzw. ausschließen. Humane Papillomvirus-Infektionen, insbesondere die latenten Infektionen, sind in der sexuell aktiven Bevölkerung sehr weit verbreitet. Man kann daher den Nachweis von HPV-Infektionen nicht automatisch mit einem Krebsrisiko gleichsetzen. Es soll unter anderem die Aufgabe unserer Studien sein, das Risiko für Sie und Ihren Partner zu untersuchen und Sie entsprechend zu beraten. Wir werden Ihnen dabei als Universitätsklinik Untersuchungsmethoden anbieten können, die bei niedergelassenen Ärzten zum Teil allein aus Kostengründen nicht möglich sind. Auch wir können die enormen Untersuchungskosten für die Laborverfahren zum Teil nur mit Forschungsmitteln decken, so daß einige Untersuchungen Ihnen lediglich im Rahmen freiwilliger Studien angeboten werden können. Das Ergebnis Ihrer persönlichen Untersuchung trägt dann in anonymisierter Form letztlich auch zum wissenschaftlichen Fortschritt auf dem Gebiet der HPV-Forschung und zu einer zukünftig besseren klinischen Beratung betroffener Patienten bei.

Dabei soll nochmals betont werden, daß kein Untersuchungsverfahren allein zu Forschungszwecken durchgeführt wird, sondern jedes Untersuchungsergebnis Ihrer speziellen Risikoabschätzung und -beratung dienen wird. Da lediglich standardisierte Untersuchungstechniken der Routine angewendet werden, bedeutet die Teilnahme an einer Studie für Sie kein besonderes Risiko oder Belastung, sondern ermöglicht allen zusätzlichen Informationsgewinn durch spezielle Laboruntersuchungen auf höchstem internationalem Niveau. Ob und in welchem Ausmaß diese Laboruntersuchungen in Ihrem Einzelfall Einfluß auf weitere diagnostische und therapeutische Maßnahmen haben werden, kann allerdings vor der Untersuchung nicht beurteilt werden.

Studienteilnehmer erhalten eine spezielle Aufklärung über alle Studienmaßnahmen, über Nebenwirkungen, Gefahren und Nachteile. Sie unterliegen einer besonderen Überwachung und Versorgung bei Auftreten von Komplikationen durch uns. Sollten widererwartend Komplikationen auftreten, sollte deshalb die Kontaktaufnahme mit uns oder Vorstellung bei uns erfolgen. Grundsätzlich ist die Teilnahme an allen Studien freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen rückgängig gemacht werden. Weder die Verweigerung zur Teilnahme an einer Studie, noch der Rücktritt von einer Studie werden Einfluß auf die Art der Diagnostik, Behandlung und Beratung durch uns haben. Alle bei uns gespeicherten persönlichen Daten der Untersuchungsergebnisse und wissenschaftlichen Fragebögen unterliegen nicht nur der ärztlichen Schweigepflicht, sondern auch dem Datenschutz. Eine Dateneinsicht durch Personen, die nicht der Klinik angehören, ist nicht vorgesehen. Bei Veröffentlichung von Daten erfolgt dies anonymisiert, d.h. ein Rückschluß auf Ihre Person wird nicht möglich sein.

Dieses Patienteninformationsblatt soll nicht das persönliche Beratungsgespräch mit Ihnen ersetzen, sondern lediglich die Gesprächsgrundlage für Ihre Untersuchung, Behandlung und Beratung bei uns bereiten. Gleichzeitig hoffen wir, eventuell bestehende Ängste vor Teilnahmen an Spezialuntersuchungen im Rahmen von Studien beseitigt haben zu können. Andernfalls möchten wir Sie herzlichst bitten, mit uns hierüber und über andere Probleme, die die HPV-Infektion für Sie und evtl. Ihren Partner mit sich gebracht hat, offen zu sprechen.

Dr. P.Schneede
Oberarzt der Klinik und Leiter der HPV-Sprechstunde

Großhadern:
81377 München
Marchioninistraße 15
Durchwahl: (089) 70 95 - 2971

Innenstadt:
80336 München
Nußbaumstraße 20
Durchwahl: (089) 51 60 - 25 51

Einverständniserklärung

Vor- und Zuname des Patienten, geb.

Mit den vorgeschlagenen Kontrolluntersuchungen zum Nachweis von Humanen Papillomvirus(HPV)-Infektionen bin ich voll einverstanden. Ich wurde über die Art, Bedeutung und typischen Gefahren wie Blutungen, Infektionen und Verletzung von Nachbarstrukturen (Gefäße, Nerven, Eichel, Schwellkörper, Harnröhre, usw.) sowie Wundheilungsstörungen aufgeklärt und habe keine weiteren Fragen. Notwendig werdende Nebeneingriffe und Zweit- eingriffe bei Komplikationen finden meine Zustimmung.

Die Kontrolluntersuchungen zum Nachweis von HPV-Infektionen umfassen neben der körperlichen Untersuchung ggf. Hautbiopsien am äußeren Genitale (inkl. Lokalanästhetikum und Hautnaht) und evtl. bei Handwarzen die Gewinnung von Hornschuppen. Bei Harnröhrenbefall und speziellen Fragestellungen werden zudem Harnröhrenabstriche gewonnen und Harnröhrenspiegelungen (inkl. Schleimhautbetäubung) vorgenommen. Blutabnahmen erfolgen ausschließlich zum Nachweis möglicher HPV-Antikörper.

Im speziellen Fall wurden darüberhinaus folgende Untersuchungen bezüglich ihres Nutzens und Risikos besprochen und vereinbart:

.....
.....

Auf eine Bedenkzeit von 24 Stunden habe ich bewußt verzichtet, ein Alternativtermin nach für mich ausreichender Bedenkzeit wurde von mir für die Untersuchungen nicht gewünscht. Mir ist bewußt, daß ich an den HPV-Nachsorge-Studien völlig freiwillig teilnehme, daß die erhobenen Ergebnisse unter Einhaltung der ärztlichen Schweigepflicht und des Datenschutzes erfaßt und gespeichert werden. Daten werden ausschließlich in anonymisierter Form weitergegeben.

München, den

.....
Unterschrift des Patienten

Die Aufklärung erfolgte durch Herrn Dr.

München, den; Uhrzeit:

.....
Unterschrift des Arztes

