

**Aus der Frauenklinik der
Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. H. G. Bender

**Immunhistochemischer Nachweis einer virulenten HPV- Infektion im
Exfoliativabstrich versus HPV- Nachweis mittels Hybrid Capture Assay.
Eine vergleichende klinische Untersuchung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**Der Medizinischen Fakultät
Der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von
Svenja Müller-Thurmann**

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Raab

Dekan

Referent: Priv.- Doz. Dr. Küppers

Korreferent: Prof. Dr. Bier

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.- Doz. Dr. med. V. Küppers für die Auswahl und Überlassung des Themas, sowie die freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. J. Mau und Dr. med. A. Drabik vom Institut der Statistik in der Medizin für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Außerdem möchte ich mich bei den medizinisch technischen Assistentinnen Frau U. Grolik, Frau H. Fröhlich, Frau U. Löhrmann und Frau E. Proche für Ihre Hilfe insbesondere bei der Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Herrn T. Thuis danke ich herzlich für die Hilfe bei der graphischen Gestaltung dieser Arbeit.

Und zuletzt möchte ich mich bei der Firma Virofem für die Überlassung der Testkits bedanken.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CI	Konfidenzintervall
Ca in situ	Carcinoma in situ
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
DAB	3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
HCA	Hybrid Capture Assay
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HGSIL	High-grade squamous intraepithelial lesion
HPV	humanes Papillomavirus
HR-HPV	High risk humane Papillomaviren
LGSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion
LR-HPV	Low risk humane Papillomaviren
NPW	Negativer Vorhersagewert
PAP	Zellabstrich vom Gebärmutterhals nach Papanicolaou
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Probeentnahme
PPW	Positiver Vorhersagewert
RNA	Ribonukleinsäure

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	8
1.1. Zervixkarzinom und seine Vorstufen	8
1.1.1. Kanzerogenese	8
1.1.2. Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN)	10
1.1.3. Zervixkarzinom	11
1.2. Humane Papillomaviren	11
1.2.1. Historische Aspekte	11
1.2.2. Typen und Subtypen	12
1.2.3. Viruspartikel und Genomaufbau	13
1.2.4. Einteilung	14
1.2.5. Infektion	14
1.2.6. Progressionsmarker	16
1.2.7. Risiko- bzw. Kofaktoren	16
1.3. Diagnostik	17
1.3.1. Morphologische Nachweismethoden	17
1.3.2. HPV- DNA- Nachweis	18
2. FRAGESTELLUNG	20
2.1. Hypothesen	20
2.2. Studienziel	21
3. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	22
3.1. Patientenkollektiv	22

3.1.1. Auswahlkriterien für die Patientensuche	22
3.1.2. Patientendaten	22
3.2. Zytologische Abstriche	23
3.2.1. Abstrichgewinnung	23
3.2.2. Papanicolaou Färbung	23
3.2.3. Münchner Klassifikation	24
3.2.4. Hybrid Capture Assay	25
3.3. Auflistung der Vorbefunde	26
3.4. Versuchsdurchführung	27
3.4.1. Versuchsmaterial	27
3.4.2. Vorbereiten der Puffer und der feuchten Kammer	27
3.4.3. Vorbereitung der Proben	28
3.4.4. Rehydrierung und Antigenbindungsstellen- Demaskierung in der Mikrowelle	28
3.4.5. Blockierung der endogenen Peroxidase	28
3.4.6. Immunhistochemische Färbung	29
3.4.7. Auswertung der Kernfärbung	30
3.5. Statistische Auswertung	31
3.5.1. Statistische Methoden und Datenanalyse	31
3.5.2. Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert	32
3.5.3. Fehlerquellen	33
4. ERGEBNISSE	34
4.1. Altersprofil	34

4.1.1. Altersstruktur der Patientinnen	34
4.2. Ergebnisse des Hybrid Capture Assays	36
4.3. Ergebnisse des Viroactiv® Tests	44
4.4. Statistik	53
4.4.1. Sensitivität und Spezifität	53
4.4.2. Positiver und negativer prädiktiver Wert	54
4.4.3. Logistische Regressionsmodelle	57
5. DISKUSSION	60
5.1. Einführung	60
5.1.1. Hintergrund der Untersuchungen	60
5.1.2. Untersuchungsmethodik	61
5.2. Darstellung und Bewertung der Ergebnisse	62
5.2.1. Altersprofil	62
5.2.2. HPV- Nachweis mittels Hybrid Capture Assay	63
5.2.3. HPV- Nachweis mittels Viroactiv® Test	65
5.2.4. HIV- Status	67
5.2.5. Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert	68
5.3. Klinische Schlussfolgerung	68
6. ZUSAMMENFASSUNG	70
7. LITERATURANGABEN	71

1. EINLEITUNG

Nach dem Mammakarzinom ist das Zervixkarzinom weltweit die zweithäufigste Todesursache bei Frauen (Klug und Blettner, 2003; Bosch et al., 2002; Fischer et al., 2001; Nobbenhuis et al., 1999; zur Hausen, 1996). Der Infektion mit humanen Papillomaviren wird eine Hauptursache in der Entstehung von zervikalen Neoplasien zugeschrieben. Das HPV wurde in nahezu 100% der invasiven Zervixkarzinome nachgewiesen (van der Graaf et al., 2002; Herrero et al., 2000; Walboomers et al., 1999). Nach Einführung von Krebsvorsorgeuntersuchungen in vielen Ländern ist die Inzidenz des Zervixkarzinoms zurückgegangen. Trotzdem erkranken nach Schätzungen allein in Deutschland etwa 6.000 Frauen jährlich neu am Zervixkarzinom, und ungefähr 2400 Frauen versterben jährlich an diesem bösartigen Tumor (Schneider et al., 2002; Deutsche Krebsgesellschaft E.V., Deutsche Krebshilfe E.V., 2001). Weltweit sind es circa 500.000 Neuerkrankungen und 350.000 Todesfälle pro Jahr, die dem Zervixkarzinom zuzuschreiben sind (Schneider et al., 2001). Diese Zahlen verdeutlichen den enormen Stellenwert von Früherkennungsmaßnahmen, damit eine rechtzeitige Diagnose und Behandlung von malignen Veränderungen der Cervix uteri ermöglicht werden kann.

1.1. Zervixkarzinom und seine Vorstufen

1.1.1. Kanzerogenese

Nichtinvasive, so genannte präkanzeröse Vorstufen des Zervixkarzinoms, gehen dem invasiven Stadium voraus. Als typischer Entstehungsort für Präneoplasien der Cervix uteri wird die Transformationszone angesehen. Das Oberflächenepithel der Portio vaginalis cervicis (Portio) besteht aus mehrschichtigem unverhornendem Plattenepithel. Der Zervikalkanal dagegen wird von Zylinderepithel ausgekleidet.

Anteile der Portio, die außerhalb des Muttermundes liegen werden als Ekto- und Anteile, die innerhalb liegen als Endocervix bezeichnet. Am besten lässt sich der Grenzbereich dieser beiden Epithelien beurteilen, wenn er im Bereich des äußeren Muttermundes, also ektozervikal liegt. Das ist bei Frauen im geschlechtsreifen Alter der Fall. Bei jungen Mädchen und Frauen nach der Menopause ist die Grenze endozervikal gelegen. An diesem Grenzbereich, der so genannten Transformationszone, finden unter hormonellem Einfluss ständig Umwandlungsprozesse (Epidermisierung durch Plattenepithel mit vermehrten Mitosen sowie Zellreifungs- und Differenzierungsvorgängen) statt (Baltzer, 2001). Unter diesen Regenerationsvorgängen ist die Transformationszone besonders vulnerabel für Infektionen z.B. mit HPV, die zu dysplastischen Zellveränderungen führen können (Fischer et al., 2001). Humanen Papillomaviren wird der entscheidende Faktor bei der Entstehung des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen zugeschrieben (Schneider et al., 2002; Ikenberg, 2002(a)(b); Ikenberg, 2001(a)). Besteht eine Infektion mit HPV im unteren Genitaltrakt über mehrere Jahre, kann sich eine Krebsvorstufe (Dysplasie, intraepitheliale Neoplasie) entwickeln. Diese präkanzerösen Veränderungen beinhalten Zell- und Zellkernveränderungen mit Zellstrukturveränderungen, Ausreifungsstörungen des Epithels und Störung der Zellschichtung (Boyle et al., 2000). Humane Papillomaviren infizieren ausschließlich Keratinozyten. Das morphologische Kennzeichen in der zytologischen bzw. in der histologischen Diagnostik einer HPV- Infektion sind Koilozyten, das sind Epithelzellen mit einer perinukleären klaren Zone und einer erhöhten Dichte des umgebenden Plasmasaums. Sie dienen als Unterscheidungskriterium zwischen einer CIN I- Läsion und einer nicht- HPV- Läsion (Roteli-Martins et al., 2001). Das morphologische Substrat genetischer Veränderungen, die im Zusammenhang der HPV-assoziierten Kanzerogenese an der Cervix uteri vorkommen, sind zervikale Dysplasien. Als wichtiger molekularer Schritt wird dabei die Integration der Virus- DNA in das Genom der Wirtszelle angesehen. Die Virus- DNA- Integration wird als Startpunkt der zervikalen Kanzerogenese aufgefasst (Richart et al., 1998). Diese Vermutung wurde 1999 von Klaes et al. bestätigt. Proben von HPV- 16 und 18 zeigten, dass normales Zervixgewebe und CIN I- Läsionen keine Viren- Integrate enthielten. Dagegen wurden bei 5% der CIN II- Läsionen und 16% der CIN III- Läsionen Integrate nachgewiesen. Das invasive Karzinom hatte mit 88% die höchste Anzahl an nachgewiesenen Integraten.

1.1.2. Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN)

Der Begriff der cervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) wurde 1967 von Richart eingeführt. Er definiert die histopathologischen Veränderungen am Zervixepithel. Dabei entspricht die leichte Dysplasie einer CIN I- Läsion und die mäßig schwere Dysplasie einer CIN II- Läsion. Die schwere Dysplasie und das Carcinoma in situ werden als CIN III- Läsion zusammengefasst. Bei der schweren Dysplasie und beim Carcinoma in situ liegt ein vollständiger Schichtungsverlust des Epithels vor. Alle Epithelzellagen weisen Mitosen auf (Baltzer, 2001). Aus jeder dieser zervikalen intraepithelialen Neoplasien kann direkt oder aber über mehrere Vorstufen ein invasives Wachstum erfolgen (Fischer et al., 2001). Das maligne Potential steigt aber mit Zunahme der strukturellen Veränderung (Baltzer, 2001). Der Hauptrisikofaktor in der Entwicklung und Progression von CIN- Läsionen wird humanen Papillomaviren zugeschrieben. Das biologische Verhalten zervikaler Präkanzerosen ist nicht eindeutig vorhersehbar, wie einige Langzeitstudien belegen (Schneider et al., 2000). Nichtinvasive Zervixneoplasien können regredieren, persistieren oder progredieren. Nach einer Metaanalyse von Östör 1993 wird angenommen, dass eine CIN I nur zu 1% zum invasiven Karzinom fortschreitet, eine CIN II kaum über 5% und sogar eine CIN III nur zu höchstens 20% nach einem Intervall von durchschnittlich 15 Jahren. Dagegen regredieren über einen entsprechend langen Beobachtungszeitraum 57% der CIN I- Läsionen, 43% der CIN II- und 32% der CIN III- Läsionen spontan. Bis zu 70% der leichtgradigen Dysplasien oder CIN I regredieren innerhalb der folgenden 5 Jahre (DGGG Empfehlung, 2001). Eine andere Klassifikation (Bethesda System, 1993), die in den USA sehr verbreitet ist, unterscheidet zwischen low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) und high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). Dabei entspricht LSIL einer CIN I und/oder einem Hinweis auf HPV- Infektion, HSIL einer CIN II oder III. Zusätzlich gibt es eine Gruppe atypischer squamöser Zellen unbestimmter Bedeutung (ASCUS).

1.1.3. Zervixkarzinom

Beim Zervixkarzinom unterscheidet man zwei größere histologische Gruppen: Das Plattenepithel- und das Adenokarzinom. In einer Übersicht von Schwartz et Weiss von 1986 entfielen von 8647 Fällen von invasiven Zervixkarzinomen 77% auf Plattenepithelkarzinome, 11% auf Adenokarzinome, 2, 5% auf adenosquamöse Karzinome und die übrigen Karzinome auf unspezifizierte epitheliale Tumoren. Die Wachstumsgeschwindigkeit des Carcinoma in situ (Ca in situ) beträgt beim Plattenepithel im Durchschnitt 18 Jahre und beim Drüsenepithel 12 Jahre (Plaxe et Saltzsein, 1999). Vom Zervixkarzinom sind in den meisten Fällen Frauen zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr betroffen.

1.2. Humane Papillomaviren

1.2.1. Historische Aspekte

1884 entwarf Chamberland einen Filter, dessen Poren groß genug waren, Viren hindurchzulassen, aber Bakterien zurückhielten (Porter, 1997). 1933 wurden Papillomaviren erstmals von einer bestimmten Kaninchenart, so genannten "cottontail rabbits" isoliert (Jastreboff et Cymet, 2002; Shope, 1933). 1935 entdeckte man, dass Papillome, durch das humane Papillomavirus hervorgerufen, das Potential besitzen, in maligne Prozesse überzugehen (Rous and Beard, 1935). 1949 wurden eine Reihe von Papillomaviruspartikeln aus Hautwarzen erstmals mit dem Elektronenmikroskop beobachtet. Epithelzellen, die von humanen Papillomaviren infiziert waren, wurden 1956 beschrieben und als Koilozyten bezeichnet (Koss et Durfee, 1956). Die genetische Struktur der Papillomaviren wurde 1963 von Crawford and Crawford entschlüsselt. Die Unmöglichkeit der kulturellen Anzucht von Papillomaviren führte in den folgenden Jahren zu keiner fortschrittlichen Neuentdeckung (Burk, 1999). Jablonska et al. sprachen nach neueren Untersuchungen 1972 von einem Zusammenhang von Papillomaviren und

Tumorgenese. In den 80`er Jahren gelang dann mit der Isolation von neuen HPV-Typen (HPV 6 und 11) von Genitalwarzen und (HPV 16 und 18) Zervixkarzinomen ein neuer Durchbruch (Boshart et al., 1984; Dürst et al., 1983; Gissmann and zur Hausen, 1982; Gissmann et al., 1980). Es dauerte aber dann noch mal ungefähr 10 Jahre, bis der kausale Zusammenhang zwischen humanen Papillomaviren und Zervixkarzinomentstehung weitgehend überall akzeptiert wurde. 1995 wurden dann die HPV- Typen 16 und 18 von der Weltgesundheitsorganisation als kanzerogen für den Menschen (group I) klassifiziert (IARC, 1995).

1.2.2. Typen und Subtypen

Es sind über 80 verschiedene HPV- Typen bekannt sowie zahlreiche HPV- DNA Fragmente, die wahrscheinlich als neue HPV- Typen eingeteilt werden (Iftner und Holz, 2002; Myers et al., 1997). Die humanen Papillomaviren stellen eine sehr heterogene Gruppe von Erregern dar. Serologische Verfahren zur Typisierung waren bisher nicht möglich, daher werden die HPV- Typen aufgrund ihrer DNA-Sequenzheterogenität in unterschiedliche Genotypen unterschieden (von Knebel Doeberitz, 1992). Bei den einzelnen HPV- Typen handelt es sich um Genotypen, bei denen sich die einzelnen Typen in der L1-, E6- und in der URR- Gen- Sequenz um mindestens 10% von jedem anderen bekannten HPV- Typ unterscheiden müssen (Tyring, 2000; de Villiers, 1997). HPV- Subtypen der einzelnen HPV- Typen unterscheiden sich in der L1- Gen- Sequenz um 2-10% voneinander, bei HPV-Varianten unterscheidet sich die DNA- Basensequenz um weniger als 2% (Tyring, 2000; Wieland und Pfister, 1996).

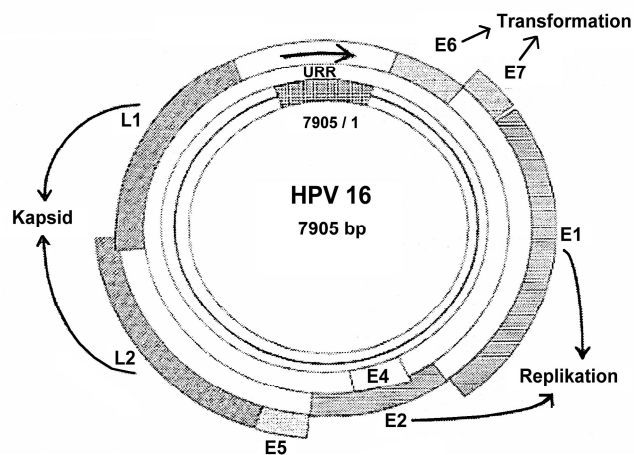
1.2.3. Viruspartikel und Genomaufbau

HPV gehören zur Familie der Papovaviren. Die Partikel der HPV sind kleine Capside ohne umgebende Membranhülle. Ihr Durchmesser beträgt 45-55 nm und die Partikel haben ein Molekulargewicht von etwa 5×10^6 Dalton. Die Capside bestehen aus 72 Capsomeren, die von den viralen Strukturproteinen L1 und L2 gebildet werden. Das virale Genom ist im Inneren der Capside untergebracht. HPV besitzen ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA- Genom, das aus ungefähr 8.000 Basenpaaren besteht. Das zirkuläre Genom wird in zwei Regionen eingeteilt. Eine Region codiert für die früh synthetisierten Strukturproteine und eine Region codiert für die spät synthetisierten Strukturproteine (von Knebel Doeberitz, 2001). Zwischen diesen beiden Regionen befindet sich die upstream regulatory Region (URR). Jedes Genom codiert für acht Virusproteine. Der frühe Genombereich codiert für die Proteine E1-E7 (E = early region), die in die DNA-Replikation, die Transkriptionskontrolle und in die zelluläre Transformation eingebunden sind. Der späte Genombereich codiert für die beiden Strukturproteine L1 und L2 (L = late region) (Tyring, 2000; Howley et al., 1990) Die vom späten Genombereich gebildeten Strukturproteine L1 und L2 werden erst in ausdifferenzierten Keratinozyten gebildet (Berumen et al., 1994). Das Hauptcapsidprotein L1 wird wesentlich stärker produziert als das in nur geringen Mengen synthetisierte L2- Protein (Howley et al., 1990). Die upstream regulatory Region codiert nicht für Proteine, sondern enthält Elemente, die in die DNA-Replikation und Transkription eingebunden sind (Tyring, 2000).

Abbildung 1 Genomkarte von HPV-16

Die Abbildung zeigt die genomische Organisation von HPV-16. Zu sehen sind die DNA-Bereiche der transformations- und replikationsrelevanten frühen (early, E) und späten (late, L) Gene, sowie der nichtkodierenden Region (upstream regulatory region, URR).

(Scheffner et al., 1994)



1.2.4. Einteilung

Von den über 80 bisher identifizierten HPV- Typen infizieren mindestens 30 ausschließlich die Haut oder Schleimhaut im Anogenitaltrakt. Die genitalen HPV-Arten können nach ihrem transformierendem Potential in 2 Gruppen eingeteilt werden: Gering (LR = low risk) - und Hochrisiko (HR = high risk) - HPV. LR HPV-Typen (z.B. 6, 11, 42, 43, 44) werden so gut wie nie bei Krebserkrankungen nachgewiesen. LR- HPV sind die Hauptverursacher von genitalen Warzen. HR HPV-Typen (z.B. 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) sind bei 99, 7% aller Zervixkarzinome gefunden worden (Iftner und Holz, 2002; Walboomers et al., 1999). 80% der Krebsfälle sind mit den 4 häufigsten HR HPV- Typen 16, 18, 31 und 45 assoziiert (Schneider und Gissmann, 2002). Eine andere Einteilung richtet sich nach dem bevorzugtem Tropismus zur Haut (dermale/kutane Typen z.B. HPV-Typen 1, 2, 4, die vor allem das verhornende Plattenepithel infizieren) oder zur Schleimhaut (mukosale Typen z.B. HPV- Typen 6, 16, 18, die insbesondere die nicht verhornenden Epithelien der Schleimhäute, bevorzugt im Genitaltrakt infizieren) (Schneider und Gissmann, 2002).

1.2.5. Infektion

Genitale HPV- Erkrankungen sind weltweit verbreitet. Es ist die häufigste sexuell übertragbare virale Erkrankung. Bei Frauen, die jünger als 30 Jahre alt sind beträgt die Infektionsrate mit HPV 10-25%, bei über 30-jährigen Frauen 5-8% (Iftner und Holz, 2002). Bei Frauen, die älter als 30 Jahre alt sind nimmt die Prävalenz der nachweisbaren HPV- Infektion ab. Der Häufigkeitsgipfel für diagnostizierbare HPV- Infektionen liegt im Alter zwischen 20 und 25 Jahren. Die kumulative Inzidenz bei jungen Frauen beträgt bis zu 50% in Abhängigkeit vom Sexualverhalten. HPV 16 ist hierbei der am häufigsten nachgewiesene Typ (Woodman et al., 2001). Nach etwa 12 Monaten ist bei 80% der infizierten Frauen HPV molekularbiologisch nicht mehr nachweisbar. Nur bei 20% der Infizierten ist eine Persistenz oder Progredienz nachweisbar. Eine schwergradige Krebsvorstufe kann sich entwickeln (Schneider et

al., 2001). Das Risiko ist bei einer Infektion mit HPV- 16 am größten mit einem Maximum 6-12 Monate nach dem ersten HPV- 16 Nachweis (Woodman et al., 2001). Eine Progression von durchschnittlich 15 Jahren wird bei 3-6% der HR- HPV- Infektionen beobachtet (Schneider et al., 2002). Eine HPV- Infektion kann latent, subklinisch oder klinisch verlaufen. Latente Infektionen, die weder zytologische Veränderungen noch klinische Zeichen aufweisen, können nur durch molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden. Bei subklinischen Infektionen können pathologische Veränderungen nur durch die Kolposkopie oder die mikroskopische Untersuchung erkannt werden, eine makroskopische Diagnose ist nicht möglich. Klinische Infektionen sind dagegen makroskopisch sichtbar, und die Patientinnen können Symptome aufweisen (Tyring, 2000). Wie andere DNA- Viren muss das humane Papillomavirus den Wirtszellapparat für die Virus- DNA- Replikation nutzen. HPV infiziert die Basalzellen des Epithels und teilt sich in den höheren mehr differenzierten Schichten des Epithels. Studien, in denen eine HPV- Infektion mittels in- situ- Hybridisierung nachgewiesen wurde, gehen davon aus, dass die Viruszellreplikation innerhalb des Zellnukleolus stattfindet (Tyring, 2000).

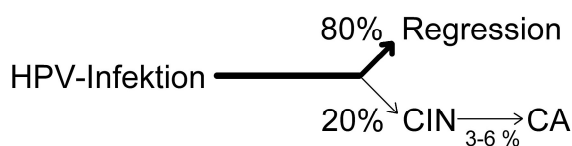


Abb. 2 ← Natürliche Entwicklungsgeschichte der HPV-Infektion der Cervix uteri. (Schneider et al., 2002)

1.2.6. Progressionsmarker

Das Ziel von Früherkennungsmaßnahmen sollte vor allem das rechtzeitige Erkennen von CIN- Läsionen sein, die zu höhergradigen Stadien progredieren. In den letzten Jahren wurde daher Wert gelegt auf die Identifikation von Faktoren, die ein Progressionsrisiko anzeigen können. Als mögliche Progressionsmarker für ein Vorschreiten von einer zervikalen Dysplasie in ein invasives Zervixkarzinom werden ein wiederholter Nachweis von so genannten onkogenen HR HPV- DNA (van der Graaf et al., 2002; Nobbenhuis et al., 1999; Clavel et al., 1999; Koutsky et al., 1992), die Integration von HR HPV- DNA in die Wirtszell- DNA (Klaes et al., 1999), eine erhöhte Viruslast von HR HPV vor allem von HPV- 16 (Josefsson et al., 2000), das Vorkommen von Varianten von HR HPV vor allem von HPV- 16 in bestimmten ethnischen Gruppen (Castaneda et al., 2001) und das Auftreten von Onkogenenvarianten bzw. eine bestimmte Prädisposition bei HPV- Infizierten. Die klinische Wertigkeit dieser Marker ist bis jetzt aber nicht eindeutig erwiesen. In frühen Präneoplasien wird das virale Genom als unabhängiges episomales Molekül repliziert. In den Karzinomzellen liegt das virale Genom in der Regel in Chromosomen der Wirtszelle integriert vor. Dies führt wahrscheinlich durch unterschiedliche Mechanismen zu einer verstärkten Expression viraler Onkogene (von Knebel Doeberitz, 2001).

1.2.7. Risiko- bzw. Kofaktoren

Nur wenige der mit HPV Infizierten erkranken an Gebärmutterhalskrebs. Das lässt den Schluss zu, dass neben HPV noch andere endogene und exogene Kofaktoren für die Entstehung eines invasiven Karzinoms verantwortlich sind. Besonders wichtig stellt sich in diesem Zusammenhang die Infektion mit HR HPV dar (Schlecht et al., 2001; Konno et al., 1998). Zusätzlich scheinen vor allem genetische Faktoren (HLA-Status und Veränderungen in den Tumorsuppressorgenen) als endogene Kofaktoren eine besondere Rolle zu spielen, denn sie erlauben dem Immunsystem nicht, die Infektion mit HPV zu beenden (zur Hausen and de Villiers, 1994). Auch einer

Immunsuppression, wie bei einer HIV- Infektion oder bei Transplantations-Patientinnen, sprechen unterschiedliche Autoren eine große Bedeutung zu (Ikenberg, 2001(b); Porreco et al., 1975). HIV- seropositive Frauen sind nach einigen Studien für dysplastische Veränderungen an der Zervix sowie für Zervixkarzinome besonders anfällig. Sinkende CD4- positive T- Lymphozytenzellzahlen werden dafür verantwortlich gemacht (Davis et al, 2001). Nach einer Studie von Karlsson et al. (1995) wird die Anzahl der Sexualpartner während des Lebens als wichtigster unabhängiger Risikofaktor angesehen. Es wird auch angenommen, dass das junge Alter zum Zeitpunkt der HPV- Infektion des Zervixepithels einen Risikofaktor darstellt (Kahn et al., 2002; Bosch et al., 2002; zur Hausen, 1996). Weitere nicht unerhebliche exogene Kofaktoren sind wahrscheinlich das Rauchen, zusätzliche infektiöse Agentien (vor allem die Infektion mit Chlamydien) und eine Estrogen- Exposition (Ikenberg, 2001(b); Walboomers et al., 1999; Roteli-Martins et al., 1998). In einer Abhandlung von Schneider et al. (2002) wird zu den exogenen Kofaktoren noch die Anzahl der Geburten hinzugefügt. Allerdings ist die Datenlage hier teilweise sehr widersprüchlich und bedarf in Zukunft noch genauerer Untersuchungen.

1.3. Diagnostik

1.3.1. Morphologische Nachweismethoden

Da den humanen Papillomaviren eine Hauptursache in der Entstehung von zervikalen Dysplasien zugeschrieben wird, kommt in der Diagnostik dem HPV- Nachweis besondere Bedeutung zu. Eine Reihe von Erkrankungen sind bereits makroskopisch als HPV- Infektion zu diagnostizieren (z.B. Condylomata acuminata, flache Papillome, bowenoide Papulose). Bei einem Großteil der HPV- assoziierten Infektionen ist die Infektion klinisch unauffällig. Ab dem 20.Lebensjahr ist bei Frauen einmal jährlich ein zytologischer Abstrich von der Cervix uteri im Rahmen der gesetzlichen Krebsvorsorge vorgesehen. Hier lassen sich morphologische Zellveränderungen des Zervixepithels nachweisen und werden nach Papanicolaou (Pap I-V) klassifiziert (Papanicolaou, 1949). Bei zytologisch auffälligen Befunden

kontrolliert man die Befunde und/oder führt die Patientin einer Kolposkopie zu, die in der gesetzlichen Krebsfrüherkennung in Deutschland leider nicht vorgesehen ist. Mit Hilfe der Kolposkopie gelingt es Diskrepanzen zwischen makroskopischem und zytologischem Befund genauer abzuklären, die Läsion zu lokalisieren, ihre Ausdehnung zu erfassen und damit einen geeigneten Biopsieort festzulegen (Baltzer, 2001). Das Betupfen der Portio mit 3% Essigsäure und die Schiller`sche Jodprobe stellen in diesem Rahmen wichtige Zusatzmethoden dar. Bei suspekten kolposkopischen und/oder zytologischen Befunden sollte eine histologische Abklärung erfolgen (Baltzer, 2001). Einige Nachteile morphologischer Untersuchungen bezüglich der Diagnostik von HPV- Infektionen sowie von zervikalen Dysplasien und Zervixkarzinomen sind einerseits die nicht sehr hohe Sensitivität der Einmaluntersuchung, die in der Literatur zwischen 20 und 95% beträgt (eine Sensitivität von 93% wird erst bei einer Abstrichserie von 4 Abstrichen erreicht) sowie die Tatsache, dass bei positiven morphologischen Ergebnissen keine Differenzierung zwischen low- und high- risk HPV Typen möglich ist (Kreienberg, 2001). Zusätzlich wird von einer geringen Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse berichtet (Schneider et al., 2000). Die nicht sehr hohe Sensitivität der Einmaluntersuchung (Rate an falsch negativen Befunden zu hoch) wird in zweidritteln der Fälle einer falschen Entnahmetechnik zugeschrieben und in einem Drittel der Fälle einer falschen Untersucherbeurteilung (Baltzer, 2001). Als Alternative stellt sich die flüssige Zytologie dar (liquid based cytology). Ihr wird im Gegensatz zum konventionellen Pap- Abstrich eine höhere Sensitivität bei ähnlicher Spezifität zugesprochen (Payne et al., 2000).

1.3.2. HPV- DNA- Nachweis

Mit dem Nachweis von viraler DNA kann eine HPV- Infektion gesichert und gleichzeitig typisiert werden. Die klassischen Methoden für den Virusnachweis wie Elektronenmikroskopie, Zellkultur und einige immunologische Methoden sind zum HPV- Nachweis nicht geeignet. In der Diagnostik werden heutzutage hauptsächlich die Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR) und die direkte Hybridisierung mit dem

Hybrid Capture Assay (HCA) genutzt (Ikenberg, 2002(b); DGGG Empfehlungen, 2001). Im Gegensatz zu anderen Methoden der HPV- DNA- Diagnostik wie z.B. in-situ Hybridisierung (ISH), Southern Blot (SB) oder Filter in-situ Hybridisierung (FISH) haben sie eine erhöhte Sensitivität (PCR und HCA) und sind technisch relativ leicht durchführbar (HCA). Bei der PCR- Methode haben sich zwei unterschiedliche Primersets etabliert: GP5+/6+ und MY09/11 (Schneider et al., 2001). Der Hybrid Capture Assay hat bisher als einziger Test eine Zulassung der amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA für den Routineeinsatz (Ikenberg, 2002(b)). Der Hybrid Capture Assay unterscheidet bis zum heutigen Zeitpunkt 13 HR- von fünf LR- Typen (Schneider et al., 2002; Castle et al., 2002). Bei der Anwendung molekularbiologischer Techniken wie PCR oder direkt Hybridisierung werden wegen der sehr hohen Sensitivität zusätzlich eine große Anzahl asymptomatischer Infektionen erfasst (Schneider, 2001). Denn das maligne Geschehen ist das ganz seltene Ereignis einer sehr häufigen Infektion.

2. FRAGESTELLUNG

2.1. Hypothesen

In vielen molekularbiologischen und epidemiologischen Studien wird der kausale Zusammenhang zwischen einer Infektion mit bestimmten Hoch- Risiko- HPV- Typen und der Entstehung eines Zervixkarzinoms dargestellt (Bosch et al., 2002). Dieses Verständnis einer virusinduzierten Karzinogenese führt zu der Überlegung, ob eine Implementation eines HPV- Nachweises zusätzlich zum zytologischen Abstrich in die Routinekrebsvorsorge eingeführt werden sollte (Klug und Blettner, 2003). Die zytologische Abstrichuntersuchung (Pap- Test), die im Rahmen der Krebsvorsorge routinemäßig durchgeführt wird, hat zu einer deutlichen Abnahme der Zervixkarzinomhäufigkeit geführt. Gleichzeitig ist die Zahl der präkanzerösen Vorstufen nicht unerheblich angestiegen (Deutsche Krebsgesellschaft E.V., Deutsche Krebshilfe E.V., 2001). Mit dem Pap- Test alleine kann jedoch kein HPV- Nachweis durchgeführt werden. Es kann weder eine Typisierung vorgenommen werden noch kann zwischen einer latenten und aktiven HPV- Infektion differenziert werden (Neumann et al.,) Die Firma Virofem propagiert, dass mit ihrem Viroactiv® Test eine aktive, produktive HPV-Infektion in histologischen und zytologischen Präparaten nachgewiesen werden kann (Ikenberg, 2002(a); Habedank et al.,) Virofem beschreibt, dass der Viroactiv® Test auf monoklonalen Antikörpern basiert, die das Kapsidprotein L1 der humanen Papillomaviren erkennen (Sapp et al., 1994). Weiterhin führen sie aus, dass dieses Virusprotein gebildet wird, wenn die virale Reproduktion abgeschlossen ist und reife Viren entstehen. Sie setzen voraus, dass in dieser aktiven Phase sich die Viren im Gewebe ausbreiten, die Viruslast sich erhöht und dadurch die Gefahr der Entartung entsteht. Die Firma Virofem postuliert, dass der Viroactiv® Test ein Frühwarnsystem darstellt, der das HPV- Hüllprotein L1 erkennt, bevor die infizierte Zelle entarten und Krebs bilden kann. Zudem kann der Viroactiv® Test bei suspekten Befunden nach Pap- Test durch einen HPV-Nachweis und eine HPV- Typisierung wichtige Hinweise für die weitere Behandlung liefern (Streeck und Hilfrich, 2000)

2.2. Studienziel

Ziel dieser retrospektiven Studie ist der Vergleich von drei verschiedenen HPV-Diagnosemöglichkeiten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten am gleichen Präparat durchgeführt werden. Die Ergebnisse des zytologischen Abstrichs sollen mit dem Hybrid Capture Test und dem Viroactiv® Test verglichen werden. Die von der Firma Virofem zum Viroactiv® Test gemachten Aussagen werden überprüft und den anderen Testergebnissen gegenübergestellt. Ferner soll der Zusammenhang von Patientinnen mit auffälligem Pap- Test (Pap- Abstrichergebnis > IIW) und einem vermehrten HPV- Nachweis analysiert werden. Es soll auch der Zusammenhang zwischen einem zytologischen Abstrichbefund und einem HPV- Nachweis untersucht werden. Zusätzlich soll diese Studie weitere Informationen über die Verbreitung von HPV liefern und Bezüge zu anderen Faktoren wie dem Patientenalter herstellen.

3. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patientenkollektiv

3.1.1. Auswahlkriterien für die Patientensuche

Das Patientenkollektiv setzt sich aus 115 Patientinnen der Dysplasiesprechstunde der Frauenklinik der Universität Düsseldorf zusammen. Diese Patientinnen wurden zuvor von einem niedergelassenen Gynäkologen routinemäßig behandelt und mit auffälligen zytologischen Vorbefunden überwiesen. Bei ihnen wurden im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung zytologische Abstriche von der Cervix uteri entnommen, mit einer zytologischen Befundnummer gekennzeichnet, nach Papanicolaou gefärbt und mit dem Hybrid Capture Assay eine HPV Nachweisuntersuchung durchgeführt. Die Abstriche wurden im zytologischen Labor der Frauenklinik der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf, nach zytologischen Befundnummern sortiert, archiviert. Alle Patientendaten und Untersuchungsergebnisse wurden in Akten gesammelt und in der Dysplasiesprechstunde der Frauenklinik der Heinrich- Heine- Universität aufbewahrt. Es wurden nur Patientinnen in diese retrospektive Studie aufgenommen, bei denen Ergebnisse von zum gleichen Zeitpunkt durchgeführten zytologischen Abstrichpräparaten mit morphologischer Bewertung und eine HPV- Nachweisuntersuchung vorlagen.

3.1.2. Patientendaten

Die Patientinnen waren in Düsseldorf und der näheren Umgebung wohnhaft. Ihr Alter lag zwischen 17 und 77 Jahren (Durchschnittsalter 35,36 Jahre). 39 der 115 Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Erstvorstellung in der Dysplasiesprechstunde

HIV- seropositiv. Teilweise wurde bei ihnen schon auswärts eine Therapie wie z.B. eine Laserkonisation aufgrund von Zervixepithelveränderungen durchgeführt. Die einzelnen Untersuchungszeiträume betragen von einer einmaligen Untersuchung bis zu 9 Jahren. Die für diese Arbeit verwendeten Abstichuntersuchungen wurden von 1986 bis 1999 entnommen (hauptsächlich von 1996 bis 1999).

3.2. Zytologische Abstriche

3.2.1. Abstrichgewinnung

Von der Cervix uteri wurden mit verschiedenen Entnahmeinstrumenten wie Watteträger oder Bürstchen ekto- und endozervikale Zellen entnommen, auf einem Objektträger ausgestrichen und sofort mit eine Mischung aus 50% Äthanol (96%) und 50% Diethylether fixiert. Beide Substanzen wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Die Abstrichentnahme und Fixierung auf einem Objektträger wurde in der Dysplasiesprechstunde der Frauenklinik der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. V. Küppers durchgeführt.

3.2.2. Papanicolaou Färbung

Nach Fixierung der zytologischen Abstriche wurde die Kernfärbung mit Hämatoxylin und die Plasmafärbung mit einer Kombination aus Orange G6 und Polychromfarbstoff durchgeführt. Die Farbstoffe wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Die Kernfärbung ermöglicht die Beurteilung der Kernstrukturen (Größe, Form und Chromatingehalt). Die Beurteilung der Zellmorphologie erfolgte mit dem Lichtmikroskop. Die Färbung der zytologischen Abstrichpräparate erfolgte im zytologischen Labor der Frauenklinik der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf.

3.2.3. Münchner Klassifikation

Die Einteilung der zytologischen Befunde wurde anhand der Münchner Nomenklatur II für die gynäkologische Zytodiagnostik (Hilgarth, 2001)) durchgeführt:

- Gruppe I negativ
- Gruppe II negativ, Entzündung
- Gruppe II W negativ, fraglich
- Gruppe III Verdächtig
- Gruppe III D leicht - mäßige Dysplasie
- Gruppe IV A schwere Dysplasie, Carcinoma in situ (Cis)
- Gruppe IV B Carzinoma in situ (Cis), invasives Karzinom nicht auszuschließen
- Gruppe V invasives Karzinom

Die Einteilung der 115 zytologischen Abstrichpräparate wurde vom zytologischen Labor der Frauenklinik der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf vorgenommen. Die 115 Abstrichpräparate der Patientinnen werden folgendermaßen klassifiziert:

- Gruppe I 29 Patientinnen
- Gruppe II 39 Patientinnen
- Gruppe II W 9 Patientinnen
- Gruppe III 0 Patientinnen
- Gruppe III D 21 Patientinnen
- Gruppe IV A 15 Patientinnen
- Gruppe IV B 1 Patientin
- Gruppe V 1 Patientin

3.2.4. Hybrid Capture Assay

Für die Anwendung im Routinebereich zum Nachweis von HPV DNA hat sich ein Sandwich- Hybridisierungsverfahren durchgesetzt, der Hybrid Capture Assay (HCA). Dies ist das Ergebnis einer umfangreichen Analyse, die im Auftrag des englischen National Health Service durchgeführt wurde. Der HCA (Digne Hybrid Capture System Digene Diagnostics, Inc. Gaithersburg, MD USA) ist ein einfacher nicht radioaktiver Immuntest, welcher RNA Proben zum Nachweis von Einzelstrang Ziel- DNA nutzt und 18 verschiedene anogenitale HPV Typen identifiziert (Hall et al., 1996). Der Test unterscheidet 5 LR HPV Typen (6,11,42,43 und 44) und 13 HR HPV Typen (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58 und 59). Es können mit diesem Testsystem lediglich Hochrisikotypen (positiv ja/nein) oder Niedrigrisikotypen separat nachgewiesen werden, eine Genotypisierung der unterschiedlichen HPV- Typen ist nicht möglich. Nach alkalischer Denaturierung mit verdünnter NaOH- Lösung zur DNA Freilegung und ihrer Aufspaltung in Einzelstränge wurden die Zellproben in einem Hybridisierungsröhrchen mit HPV RNA Sonden (RNA Sonden von 5 LR HPV Typen und RNA Sonden von 13 HR HPV Typen) zusammengebracht. Bei Vorhandensein von Ziel- DNA wurden RNA- DNA- Hybride gebildet. Anschließend fand durch polyklonierte Antikörper, die spezifisch mit RNA- DNA Hybriden reagierten, eine Bindung von RNA- DNA Hybriden auf der Oberfläche eines Captureröhrchens statt. Die nicht reagierende Probe wurde nicht auf der Röhrchenoberfläche gebunden und abgewaschen. Daraufhin zugesetzte monoklonale Antikörper waren mit einer spezifischen alkalischen Phosphatase konjugiert und lagerten sich an die gebundenen Hybride an. Nach Chemilumineszenz- Substratzugabe, das spezifisch von der alkalischen Phosphatase des Konjugats gespalten wurde, wurden Lichtblitze freigesetzt. Diese Lichtblitze wurden von einem Luminometer (Firma Berthold, Bad Wildbad) als "relative light units" (RLU's) gemessen. RLU- Werte, die größer oder gleich dem ermittelten Grenzwert waren, zeigten, dass im Patientenmaterial HPV DNA vorhanden war. RLU- Werte unterhalb des Grenzwertes gaben an, dass keine Infektion mit den in der Sondenmischung vorhandenen HPV- Typen vorlagen oder die HPV- Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes lagen. Die Menge des emittierten Lichts war direkt proportional zu dem Gehalt an Virus DNA in der untersuchten Probe. Der Test lieferte somit einen Hinweis über die

Viruskonzentration im Untersuchungsmaterial, ohne jedoch eine genaue quantitative Aussage gemacht zu haben. Die Untersuchung auf eine HPV Infektion erfolgte im onkologisch- immunologischen Labor der Frauenklinik der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf. Der Hybrid Capture Assay hat als bisher einziger HPV- Nachweistest eine Zulassung für den Routineeinsatz von der amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA erhalten.

3.3. Auflistung der Vorbefunde

Die Patientendaten, die aus den Akten zusammengetragen worden sind, wurden in spezielle Listen übertragen. Diese Listen enthielten den Namen der Patientin, ihren Wohnort, ihr Alter, ihren behandelnden niedergelassenen Gynäkologen, ihren HIV- Status (seropositiv bzw. seronegativ), ihre zytologische Befundnummer (bei Mehrfachbefunden nach Größe und Jahresangabe sortiert), ihr zytologisches Befunddatum (Abstrichentnahme), ihre zytologische Befundeinteilung nach der Münchner Klassifikation, ihr HCA- Ergebnis für LR HPV und HR HPV getrennt aufgeführt, ihren Kolposkopiebefund (falls durchgeführt), ihren histologischen Befund (falls Biopsien entnommen wurden), Angaben über Geburten (spontan oder Sectio) und Aborte, Angaben über zusätzliche Infektionen und Beschwerden wie z.B. eine Pilzinfektion oder Pruritus vulvae.

3.4. Versuchsdurchführung

3.4.1. Versuchsmaterial

Viroaktiv® HPV Screening Pur VASP (panreaktiv außer HPV 1, 40 und 63), ein monoklonaler Maus- Antikörper, wurde von der Firma Virofem Diagnostica GmbH (Wiesbaden) bezogen. Peroxidase Mouse PK4002 IgG Vectastain ABC Kit (zur Herstellung des Kaninchenserums, des biotinylierten Sekundär- Antikörpers und des Avidin- Biotin-Komplexes) wurde von der Firma Vector Laboratories (Burlingame, CA 94010) bezogen. DAB Chromogen Peroxidase Substrat wurde von der Firma Scy Tek (Utah 84321, USA) bezogen. Mayers Hämalaunlösung wurde von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Aquamount Gurr wurde von der Firma BDH Laboratory Supplies (Poole, England) bezogen. Die einzelnen Substanzen zur Herstellung des PBS Puffers, des Zitratpuffers und der 2N NaOH wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

3.4.2. Vorbereiten der Puffer und der feuchten Kammer

Zitratpuffer-Herstellung:

10,5g Citronensäure- Monohydrat und 500ml Aqua dest. wurden gut gemischt. Zur genauen ph- Wert- Einstellung auf 6,0 wurden 2N NaOH (80g auf 1l Aqua dest.) tröpfchenweise langsam dazugegeben. Dann wurde der Puffer 1:10 verdünnt. PBS Puffer-Herstellung: 80g NaCl, 5,71g Na₂HPO₄ + 2H₂O und 2g KH₂PO₄ ad 1000ml Aqua dest.. Zur genauen ph- Wert- Einstellung auf 7,4 wurden 2N NaOH tröpfchenweise langsam dazugegeben. Dann wurde der Puffer 1:10 verdünnt.

Feuchte Kammer:

In einer verschließbaren Plastikschaale wurde der Boden mit Wasser bedeckt. Die Ablagefläche für die Objektträger kam mit dem Wasser nicht in Kontakt.

3.4.3. Vorbereitung der Proben

Damit die Abstrichzytologien erneut bearbeitet werden konnten, mussten als erster Schritt die Deckgläser der Objektträger entfernt werden. Dazu wurden die nach Papanicolaou gefärbten Abstrichpräparate mindestens eine Woche in eine Küvette mit Xylollösung eingestellt.

3.4.4. Rehydrierung und Antigenbindungsstellen- Demaskierung in der Mikrowelle

Die Abstrichpräparate und eine Positivkontrolle, welche ab hier mitgeführt wurde, wurden über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Dazu erfolgte eine Einstellung der Objektträger von je 5 min. in 99%, 80%, 70% Alkohol und PBS- Puffer in einer Küvette. Anschließend wurden die Präparate vollständig mit Zitratpuffer bedeckt und für 1 mal 6 min. und 2 mal 5 min. bei voller Leistung in der Mikrowelle gekocht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Präparate immer mit Zitratpuffer bedeckt waren. Danach wurden die Präparate in Zitratpuffer für mindestens 30 min. bei Raumtemperatur abkühlt.

3.4.5. Blockierung der endogenen Peroxidase

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden auf die Objektträger 2 Tropfen (100µl) 3% H₂O₂ getropft und die Präparate daraufhin 15 min. bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.

3.4.6. Immunhistochemische Färbung

Der immunhistochemische Antigennachweis des viralen Kapsidproteins L1 der humanen Papillomaviren in zytologischen Abstrichen erfolgte mittels der Avidin-Biotin-Complex-Methode. Das vom HPV Screening-Antikörper VASP nachgewiesene Kapsidprotein L1 wird in den sich differenzierenden Epithelzellen ausschließlich in der Spätphase einer produktiven Infektion synthetisiert und zur Bildung infektiöser Viren benötigt. Da Papillomaviren sich im Zellkern der Wirtszelle vermehren, werden bei der immunhistochemischen Färbung durch die Test-Antikörper nur die Zellkerne der infizierten Wirtszellen markiert (Streeck et Hilfrich, 2000). Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurden 3 Tropfen Kaninchenserum (Vectastain ABC-Peroxidase Kit) mit 10ml PBS Puffer gut vermischt. 4 Tropfen (200µl) der hergestellten Verdünnung wurden auf jeden Objektträger aufgetragen und 30 min. bei 37°C inkubiert. Dann wurde das überschüssige Serum abgeklopft. Die Präparate wurden nicht im PBS Puffer gewaschen! Der Primär-Antikörper, der monoklonale Maus-Antikörper (Viroaktiv HPV Screening Pur), wurde dann auf die Objektträger aufgetragen, so dass alle Abstrichzellen bedeckt waren, und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der biotinylierte Sekundär-AK (Vectastain ABC-Peroxidase Kit) in Kit abhängiger Verdünnung (1 Tropfen Reagenz blau, 3 Tropfen Reagenz gelb und 10 ml PBS Puffer wurden vermischt) mit 2 Tropfen (100µl) auf den Objektträger aufgebracht und 30 min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC-Peroxidase Kit) durch Mischung von 2 Tropfen Reagenz A, 2 Tropfen Reagenz B und 10 ml PBS Puffer hergestellt und 30 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Komplex wurde dann mit 2 Tropfen (100µl) auf die Präparate aufgebracht und 30 min. bei 37°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die DAB Chromogen Peroxidase Substratlösung (Färbung) folgendermaßen frisch hergestellt:

50µl DAB Chromogen und 1ml Substrat wurden vermischt. Bei der Herstellung war höchste Vorsicht geboten (Handschuhe mussten getragen werden, da die Substanz kanzerogen ist!). Die Objektträger wurden dann mit 2 Tropfen (100µl) Substratlösung benetzt und 6 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte darauf in Hämalaun für 5 sec.. Die Präparate wurden zum Bläuen in eine Küvette mit Leitungswasser eingestellt. Das Wasser wurde so lange gewechselt bis keine

Farbwolken von den Präparaten mehr abgingen. Danach wurden die Präparate in sauberem Leitungswasser 10 min. stengelassen. Die gefärbten Präparate wurden mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquamount eingedeckt. Die Präparate wurden nach jedem Schritt (außer nach dem Auftragen von Kaninchenserum) 5 min. in PBS Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Präparate lichtmikroskopisch nach der Kernfärbung ausgewertet.

3.4.7. Auswertung der Kernfärbung

Die Auswertung der Kernfärbung erfolgte nach folgenden Kriterien:

Färbte sich der Kern an, wurde der Test als positiv gewertet. Erfolgte keine Anfärbung des Zellkerns, wurde der Test als negativ gewertet. Die Beurteilung der Ergebnisse wurde von dem zytologischen Labor der Frauenklinik der Heinrich-Heine- Universität überprüft. Bei fraglichen Befundergebnissen wurden die Abstrichbefunde zusätzlich von Prof. H. Griesser des Pathologischen Instituts der Bayrischen Julius- Maximilians Universität Würzburg ausgewertet.

3.5. Statistische Auswertung

3.5.1. Statistische Methoden und Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte zunächst deskriptiv. Qualitative Daten und Merkmalsausprägungen wurden als Häufigkeiten entweder absolut oder zur besseren Anschauung als Prozentwerte dargestellt. Folgende statistische Tests wurden für quantitativ stetige Merkmale durchgeführt:

Die statistische Signifikanz von Untersuchungsergebnissen wurde anhand von zweidimensionalen Kreuztabellen überprüft. Eine Aussage wurde als signifikant bewertet, wenn das Signifikanzniveau α kleiner als 0,05 ($p < 0,05$) war. Häufigkeiten und diskrete Parameter mit mehreren Merkmalsausprägungen wurden in Abhängigkeit der Anzahl ihres Auftretens mit Hilfe des Fisher- Exact- Tests ($n < 5$) für Vierfelder- Tafeln oder des Chi- Square- Tests ($n > 5$) ohne Adjustierung für multiples Testen durchgeführt. Die statistische Auswertung des Datenmaterials im Hinblick auf Abhängigkeiten und Verteilungsunterschiede erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes SAS 6.12 für Unix (Sachs, 1978). Die Auswertung der statistischen Daten wurde mit Unterstützung des Instituts für Statistik in der Medizin der Heinrich- Heine- Universität unter Leitung von Prof. Mau durchgeführt.

3.5.2. Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Voraussagewert

Diagnose lautet:	tatsächliche Situation:	
	krank (positiv)	gesund (negativ)
krank (positiv)	richtige Entscheidung A	falsch positiv Fehler 1.Art B
gesund (negativ)	falsch negativ Fehler 2.Art C	richtige Entscheidung D

Es gelten folgende Definitionen:

Fehler 1.Art	ein Gesunder kann als krank eingestuft werden (falsch positiv)
Fehler 2.Art	ein Kranker kann als gesund eingestuft werden (falsch negativ)
Sensitivität	ist die Anzahl richtig positiver Tests/ Anzahl aller positiven Fälle $= A/(A+C) = 1 - \text{Fehler 2.Art}$
Spezifität	ist die Anzahl richtig negativer Tests/ Anzahl aller negativer Fälle $= D/(B+D) = 1 - \text{Fehler 1.Art}$
positiver Vorhersagewert	Anzahl richtig positiver Tests/Anzahl aller positiven Tests $= A/(A+B)$
negativer Vorhersagetest	Anzahl richtig negativer Tests/Anzahl aller negativer Tests $= D/(C+D)$

Für alle Tests gilt:

Eine Aussage wurde als signifikant bewertet, wenn das Signifikanzniveau α kleiner als 0,05 war ($p < 0,05$) (Hilgers et al., 2003; Harms, 1998).

3.5.3. Fehlerquellen

Jede Untersuchung ist abhängig von der Qualität des Untersuchers und der angewandten Untersuchungsmethode. Das Ziel dieser Studie war der Vergleich drei unterschiedlicher Diagnoseverfahren zur Erkennung von prämaligen bzw. malignen Veränderungen an der Cervix uteri. Ein neuer HPV- Erkennungstest (Viroactiv® Test) sollte dabei auf seine Aussagekraft hin überprüft werden. Die HPV- Testergebnisse des Viroactiv® Tests wurden mit den Untersuchungsergebnissen des Hybrid Capture Assays und der zytologischen Analyse verglichen. Die zytologische Untersuchung galt in dieser Studie als Ausgangsuntersuchungsverfahren. Der Nachweis von prämaligen und malignen Zellveränderungen der Portiooberfläche sowie des Zervixkanals ist die seit 40 Jahren etablierte Methode der Zytologie. Sie besitzt eine hohe Spezifität und gilt daher als die Standard- Screening- Methode für die Diagnostik von zervikalen Veränderungen. Die Sensitivität dieser Untersuchungsmethode geriet in den letzten Jahren zunehmend in die Kritik. Es wurde eine zu hohe Rate an falsch negativen Ergebnissen bemängelt. Diese Rate an falsch negativen Ergebnissen der Zytologie kann aber durch regelmäßige Testwiederholungen erheblich reduziert werden.

4. ERGEBNISSE

4.1. Altersprofil

4.1.1. Altersstruktur der Patientinnen

In der vorliegenden Arbeit wurden Patientinnen im Alter von 17 bis 77 Jahren untersucht.

Das Durchschnittsalter aller 115 Patientinnen betrug zum Zeitpunkt ihrer Erstvorstellung in der Dysplasiesprechstunde insgesamt 35,36 Jahre. Das jeweilige durchschnittliche Alter der einzelnen Patientengruppen und die Patientinnenanzahl in den drei gebildeten Alterszeitspannen (17 bis 25 Jahre, 26 bis 35 Jahre und 36 bis 77 Jahre) ist aus der folgenden Tabelle (**Tabelle I**) zu entnehmen:

Untersuchungsgruppen	Durchschnittsalter (in Jahren)	17-25 Jahre	26-35 Jahre	36-77 Jahre
Pap I+II (n=68)	36,99	8	30	30
Pap IIW (n=9)	31,34	3	3	3
Pap IIID (n=21)	33,24	5	10	6
Pap IVA+IVB (n=16)	31,38	2	11	3
Pap V (n=1)	74,00	0	0	1

Tabelle I: Altersdaten der Patientinnen

Patientinnen der Altersgruppe 26-35 Jahre waren mit 46,96% (n=54) am häufigsten vertreten. In der Altersgruppe der 36-77 jährigen waren 37,39% (n=43) der Patientinnen vertreten. 62,61% (n=72) der Patientinnen waren unter 36 Jahre und 15,65% (n=18) der Frauen waren unten 26 Jahre alt. Frauen, die zytologisch einen Pap I bzw. einen Pap II- Befund aufwiesen, waren im Durchschnitt 37 Jahre alt. Das Durchschnittsalter der Frauen mit einem Pap IIW- Befund lag bei 31 Jahren, bei Frauen mit einem IIID- Befund bei 33 Jahren, bei Frauen mit einem IVA- oder IVB- Befund bei 31 Jahren und die eine Patientin mit einem Pap V- Befund war 74 Jahre alt.

Zur Veranschaulichung der Altersdaten der Patientinnen in Bezug auf die zytologische Befundverteilung wurde ein Altersprofil in Form eines Säulendiagramms (**Abbildung I**) erstellt.

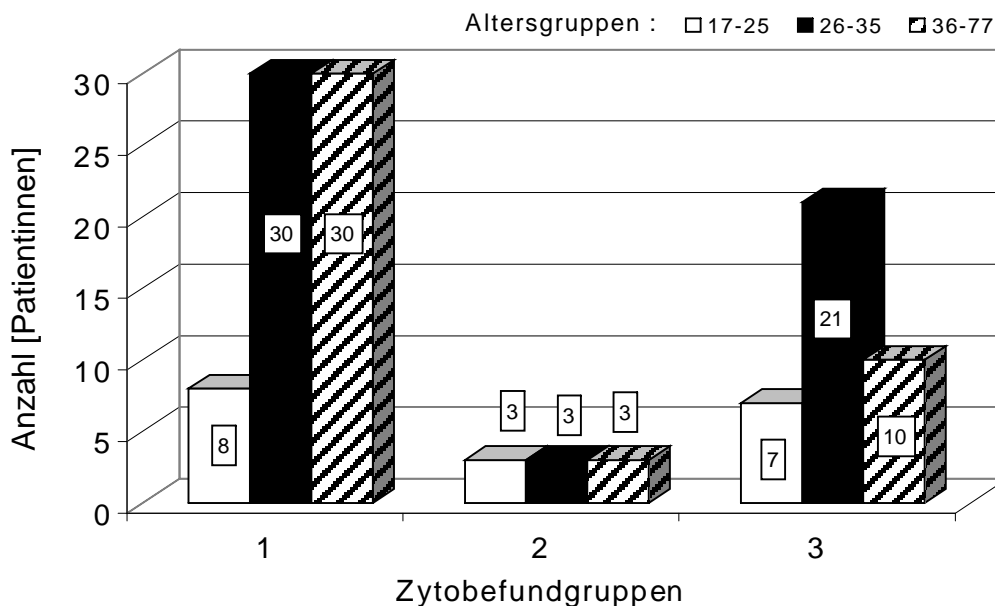


Abbildung I: Vergleich von Altersstruktur und Zytobefund im Gesamtkollektiv

In der **Abbildung I** sind unter 1 die Pap- Befunde I und II zusammengefasst. Diese Patientinnengruppe ist als "zytologisch gesund" definiert. 2 entspricht in der Abbildung dem Pap- Befund IIW. Unter 3 sind die Pap- Befunde IIID, IVA, IVB und V zusammengefasst. Die Befunde reichen von einer Dysplasie bis hin zum invasiven Karzinom. Patientinnen mit unauffälligem Pap- Abstrich (Pap I und II) waren in dieser

Studie gleichmäßig mit je 44,12% (n=30) auf die Altersgruppe der 26-35jährigen und der 36-77jährigen verteilt. Patientinnen mit einem fraglich auffälligen Befund (IIW), die aber in dieser Arbeit zu den nicht dysplastischen Veränderungen gezählt wurden, waren gleichmäßig mit je 33,33% (n=7) auf alle 3 Altersklassen verteilt. Bei den Patientinnen mit einem Pap- Befund ab IID waren die 26-35jährigen mit 55,26% (n=21) am stärksten vertreten. Die 36-77jährigen waren mit 26,32% (n=10) und die 17-25jährigen mit 18,42% (n=7) vertreten. Die Berechnung mit dem Fisher Exact Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen nicht signifikanten p-Wert von 0,199 ohne Adjustierung für multiples Testen. Das durchschnittliche Alter der Frauen mit verschiedenen Pap-Befunden unterschied sich nicht signifikant voneinander.

4.2. Ergebnisse des Hybrid Capture Assays

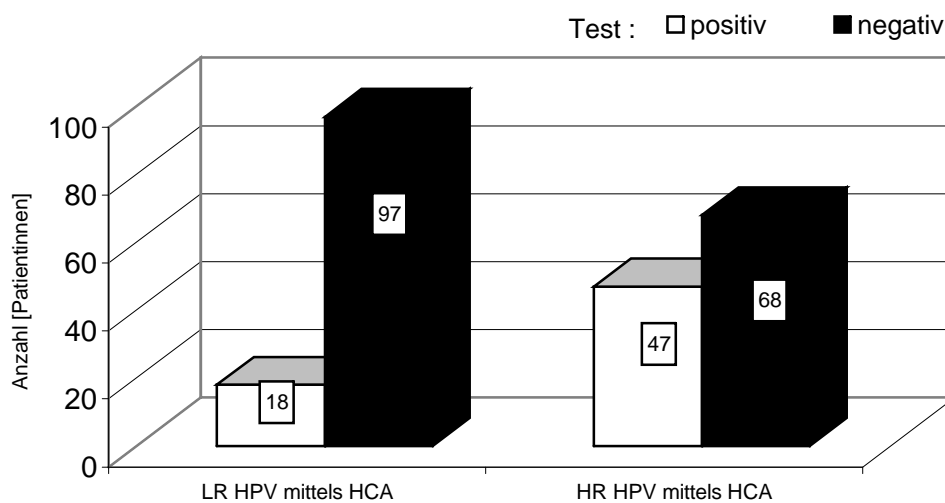


Abbildung II: Darstellung der Hybrid Capture Assay- Befunde für Low Risk und High Risk- HPV für das Gesamtkollektiv

Durch den Hybrid Capture Assay konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass 15,65% (n=18) der 115 Patientinnen mit Low Risk HPV (LR HPV) und 40,87% (n=47) der 115 Patientinnen mit High Risk HPV (HR HPV) zum Untersuchungszeitpunkt infiziert waren. Als HPV positiv wurden in den folgenden Analysen die Patientinnen angesehen, bei denen mindestens einer der beiden HPV-Tests (LR/HR) durch den Hybrid Capture Assay positiv ausfiel.

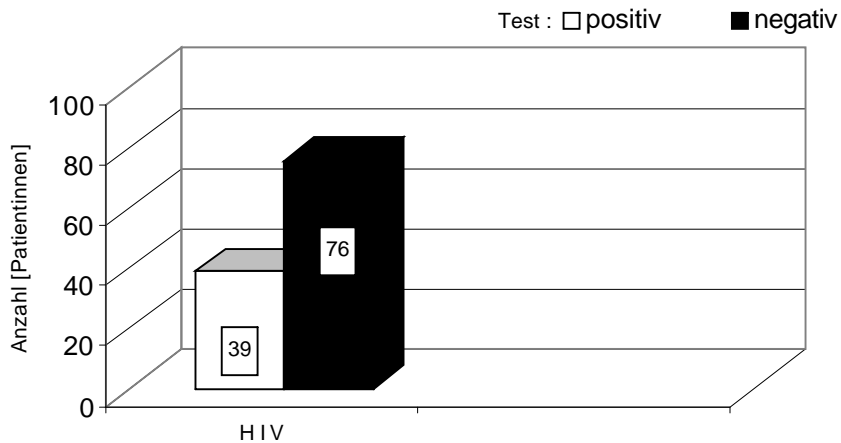


Abbildung III: HIV-Status für das Gesamtkollektiv

33,9% (n=39) der 115 Patientinnen waren zur Zeit der Untersuchung HIV seropositiv und 66,1% (n=76) der Patientinnen waren HIV seronegativ.

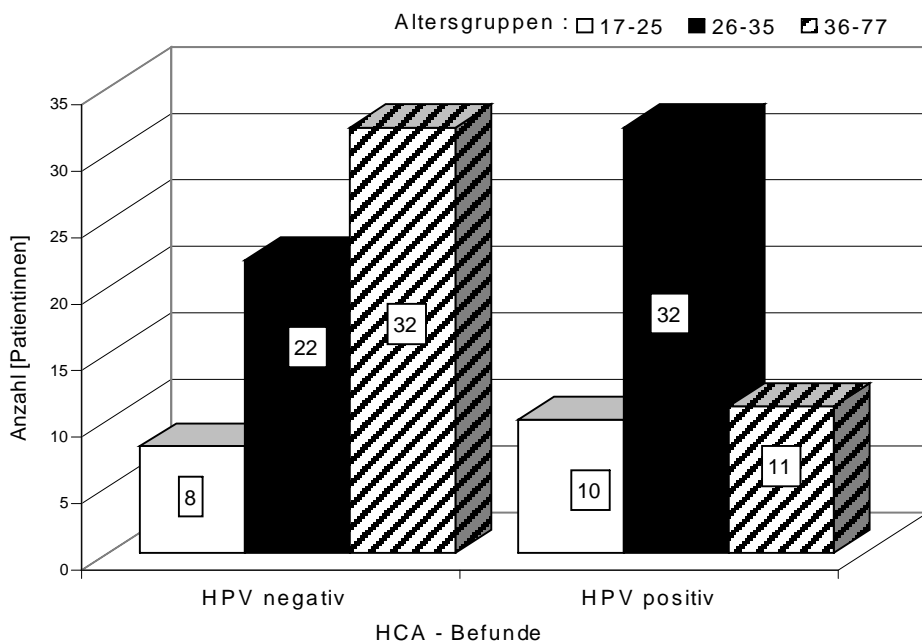


Abbildung IV: Vergleich von Altersverteilung und HPV- Test Befundung durch den Hybrid Capture Assay im Gesamtkollektiv

Der Patientenanteil der 26-35jährigen war mit 60,38% (n=32) bei den HPV positiven Patientinnen am höchsten, gefolgt von 20,75% (n=11) der 36-77jährigen. Die 17-

25jährigen machten mit 18,87% (n=10) den geringsten Anteil der HPV positiven Patientinnen aus. Bei 62 von 115 Patientinnen fiel der HPV- Test negativ aus. Der größte Anteil der negativen Testergebnisse war in der Gruppe der 36-77jährigen mit 51,61% (n=32) zu finden. Bei den 26-35jährigen waren 35,48% (n=22) der Patientinnen Test negativ. In der Altersgruppe der 17-25jährigen waren mit 12,9% (n=8) die geringste Anzahl an Test negativen Ergebnissen zu finden. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Chi- Square Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen **signifikanten** p- Wert von 0,003 ohne Adjustierung für multiples Testen.

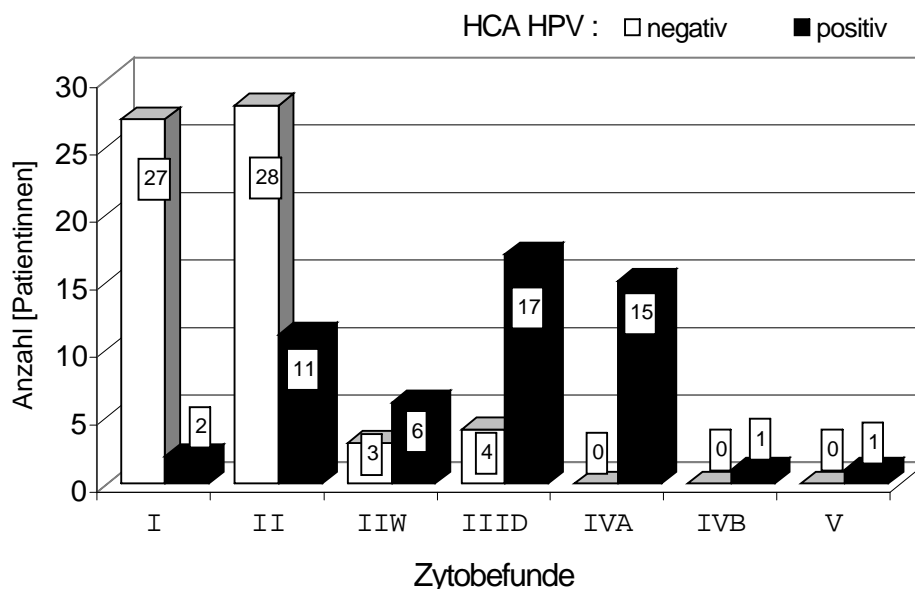


Abbildung V: Darstellung der HPV- Test Befundung durch den Hybrid Capture Assay im Vergleich zur zytologischen Befundverteilung

62,54% der durch den Hybrid Capture Assay getesteten Patientinnen waren in dieser Arbeit HPV negativ. Die HPV Befundergebnisse verteilten sich wie folgt auf die einzelnen Pap- Abstrich Einteilungen:

93,10% (n=27) der Patientinnen mit einem Pap I- Befund waren HPV negativ. Bei den Patientinnen mit einem Pap II- Befund war immer noch der größte Anteil mit 71,79% (n=28) HPV negativ. Die Patientinnen mit einem Pap IIW Befund hatten nur

noch in 33,33% (n=3) einen negatives HPV Testergebnis. Nur noch 19,05% (n=4) der Patientinnen mit einem Pap IIID waren HPV negativ. Die Patientinnen mit einem Pap IVA, IVB, und V waren alle HPV positiv. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Fisher Exact Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen **signifikanten** p- Wert von $1,11 \cdot 10^{-12}$ ohne Adjustierung für multiples Testen.

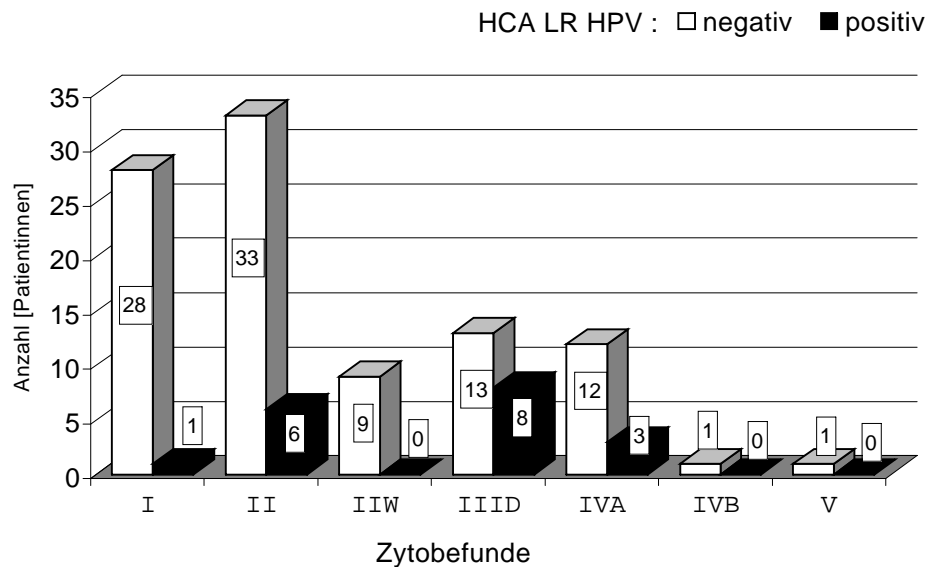


Abbildung VI: Darstellung der Low Risk HPV Hybrid Capture Assay-Befundverteilung im Vergleich zur zytologischen Befundverteilung

In **Abbildung VI** ist die Verteilung der LR HPV- Befunde in Bezug auf den zytologischen Befund graphisch dargestellt. 83,34% (n=15) der positiven HPV-Befunde sind auf die zytologischen Befunde I, II, IIW und IIID verteilt. Es gibt zwei Peaks bei den Zytobefunden II mit 33,33% (n=6) und IIID mit 44,44% (n=8). Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Fisher Exact Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen **signifikanten** p-Wert von 0,029 ohne Adjustierung für multiples Testen.

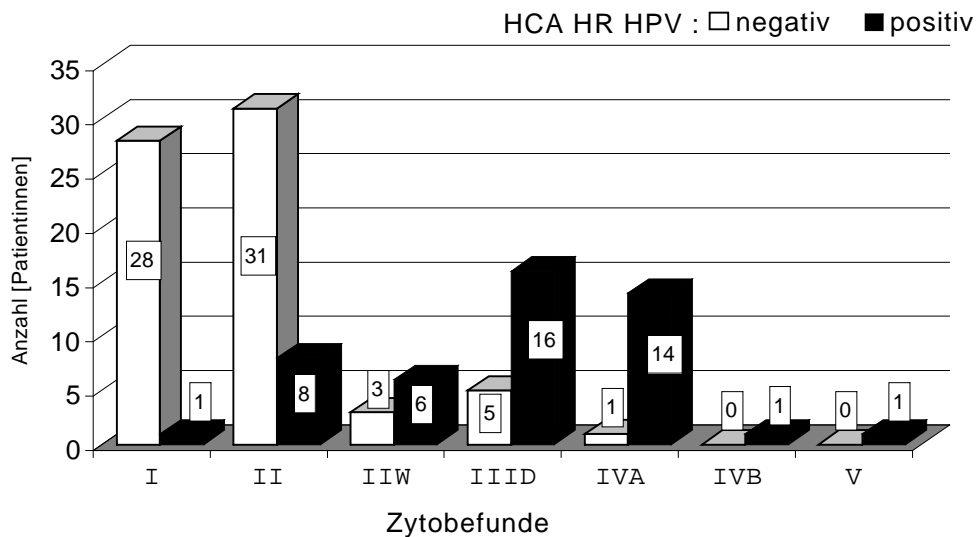


Abbildung VII: Darstellung der High Risk HPV Hybrid Capture Assay-Befundverteilung im Vergleich zur zytologischen Befundverteilung

In **Abbildung VII** ist die Verteilung der HR HPV- Befunde in Bezug auf den zytologischen Befund dargestellt. 68,09% (n=32) der positiven HPV- Befunde sind auf die zytologischen Befunde IIID, IVA, IVB und V verteilt. Ein Peak ist bei den Zytobefunden IIID und IVA mit 63,83% (n=30). Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Fisher Exact Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen **signifikanten** p-Wert von $5,66 \cdot 10^{-13}$ ohne Adjustierung für multiples Testen.

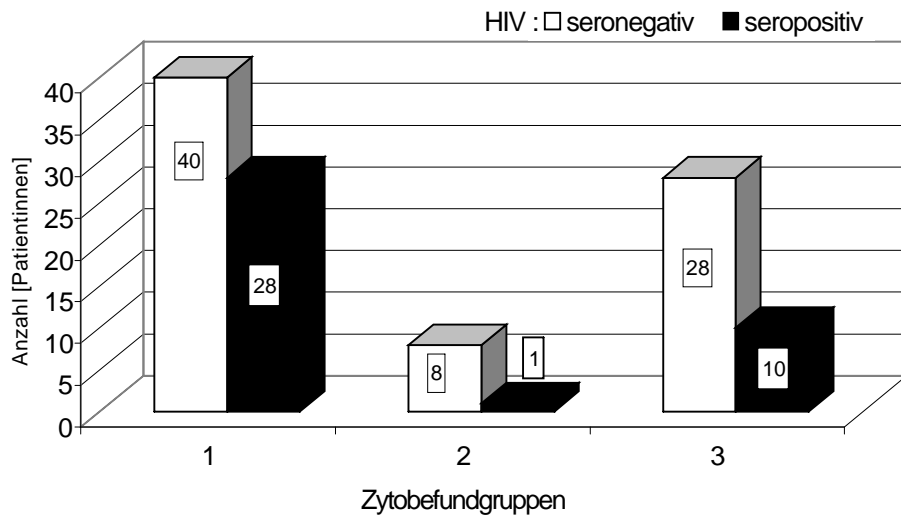


Abbildung VIII: Vergleich des HIV- Status und der zytologischen Befundung im Gesamtkollektiv

33,91% (n=39) der in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen wurden HIV seropositiv getestet. Die HIV seropositiven Patientinnen waren mit 41,18% (n=28) in der Gruppe der Pap I- und Pap II- Befundeten am stärksten vertreten. Nur 11,11 (n=1) der Patientinnen mit einem IIW Pap Befund waren HIV seropositiv. 26,32 (n=10) der Patientinnen mit einem Pap Befund ab IIID waren HIV seropositiv. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Chi- Square Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen nicht signifikanten p- Wert von 0,097 ohne Adjustierung für multiples Testen.

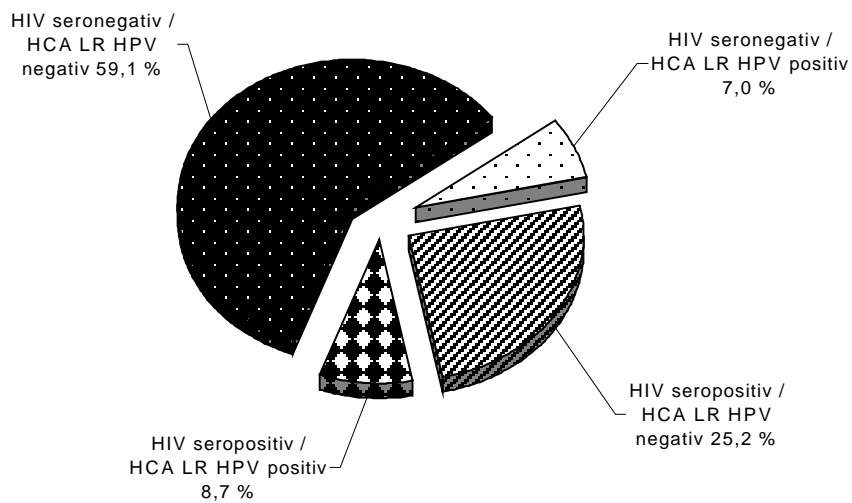


Abbildung IX : Vergleich des HIV-Status und der Low Risk HPV Befundung durch den Hybrid Capture Assay

59,13% der untersuchten Patientinnen waren HIV seronegativ und hatten einen negativen LR HPV Hybrid Capture Test. Bei 8,7% der Patientinnen, die HIV seropositiv waren, fiel der LR HPV Hybrid Capture Assay auch positiv aus. Bei 25,22% der Frauen mit einem seropositiven HIV Test war das Ergebnis des LR HPV Hybrid Capture Assays negativ. 6,96% der Patientinnen, die HIV seronegativ getestet waren, fiel der LR HPV Hybrid Capture Assay positiv aus. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Chi- Square Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen **signifikanten** p- Wert von 0,035 ohne Adjustierung für multiples Testen.

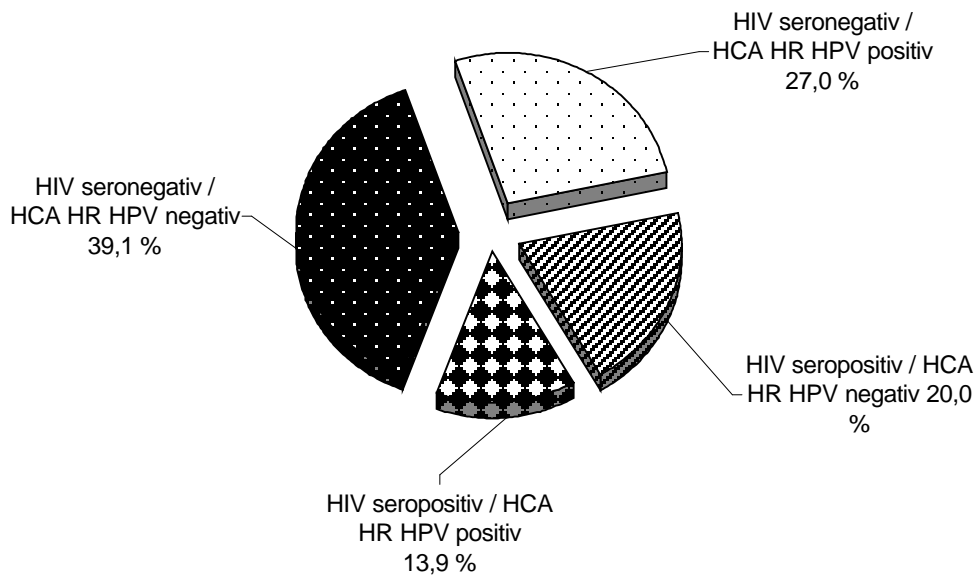


Abbildung X : Vergleich des HIV-Status und der High Risk HPV Befundung durch den Hybrid Capture Assay

Bei 39,13% der Patientinnen, die HIV seronegativ getestet waren, fiel der HR HPV Hybrid Capture Assay negativ aus. Dagegen fiel der HR HPV Hybrid Capture Assay bei 26,96% der HIV seronegativ getesteten Patientinnen positiv aus. 13,91% der Patientinnen wurden HIV seropositiv getestet und hatten ein positives HR HPV Hybrid Capture Assay- Ergebnis. 20% der HIV seropositiven Patientinnen hatten einen negativen HR HPV Hybrid Capture Assay. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Chi- Square Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen nicht signifikanten p- Wert von 0,981 ohne Adjustierung für multiples Testen.

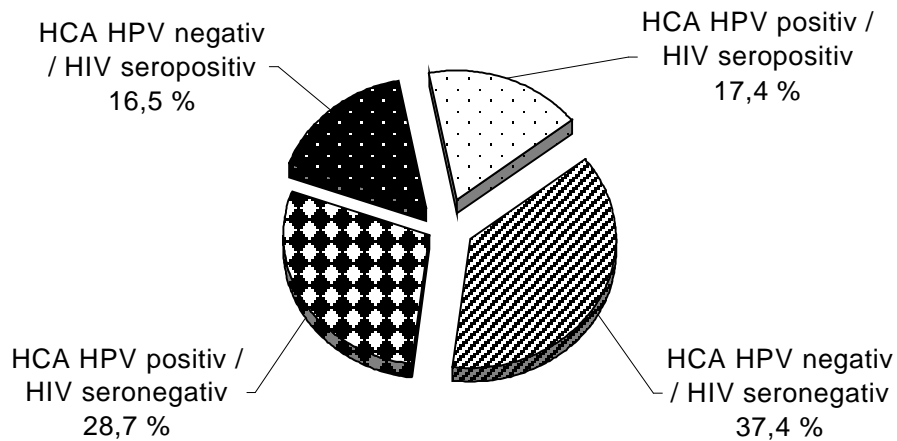


Abbildung XI: Vergleich des HIV- Status und der HPV Befundung durch den Hybrid Capture Test im Gesamtkollektiv

43 der seronegativen HIV- Patientinnen wiesen einen negativen HPV Hybrid Capture Test auf. Bei 20 Patientinnen fielen beide Testergebnisse positiv aus. 33 Patientinnen hatten einen positiven HPV Hybrid Capture Test und ein seronegatives HIV Testergebnis. 19 Patientinnen hatten ein negatives HPV Hybrid Capture Testergebnis und einen seropositiven HIV Test. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Chi- Square Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen nicht signifikanten p- Wert von 0,423 ohne Adjustierung für multiples Testen.

4.3 Ergebnisse des Viroactiv® Tests

Die Ergebnisse des Viroactiv® Tests auf das Patientinnenalter bezogen sind in dem folgenden Säulendiagramm (**Abbildung XII**) veranschaulicht:

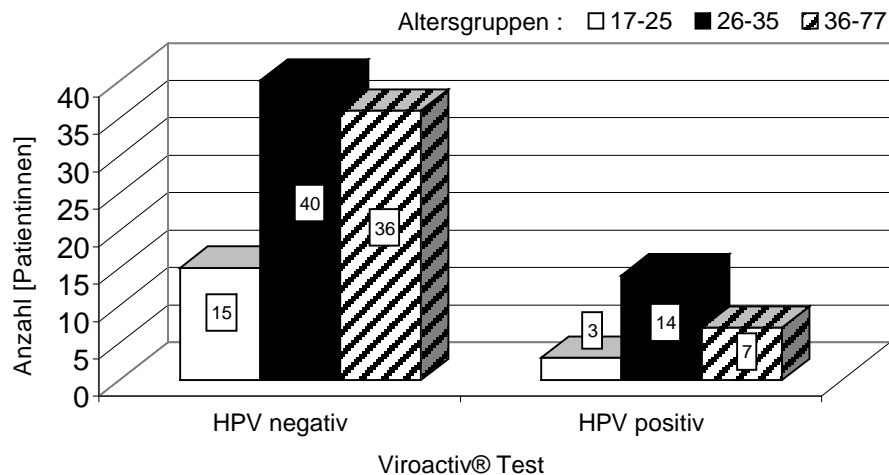


Abbildung XII: Vergleich der Altersstruktur und des Viroactiv® Tests im Gesamtkollektiv

79,13% (n=91) der Patientinnen wiesen einen negativen Viroactiv® Test auf. Davon waren 43,96% (n=40) in der Altersklasse der 26-35jährigen vertreten. 39,56% (n=36) der Patientinnen waren in der Altersklasse der 36-77jährigen zu finden, und nur 16,48% (n=15) der 17-25jährigen hatten einen negativen Viroactiv® Test. Bei den Viroactiv® HPV positiv Getesteten war der überwiegende Anteil der Patientinnen mit 58,33% (n=14) in der Gruppe der 26-35jährigen vertreten. Dann folgte der Anteil der 36- 77jährigen mit 29,17% (n=7) und zuletzt der Anteil der 17-25jährigen mit 12,5% (n=3). Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Chi- Square Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen nicht signifikanten p- Wert von 0,454 ohne Adjustierung für multiples Testen.

Die Verteilung der immunhistochemischen (Viroactiv®) HPV getesteten Patientinnen auf die einzelnen zytologischen Befunde ist in dem nächsten Säulendiagramm (**Abbildung XIII**) aufgeführt:

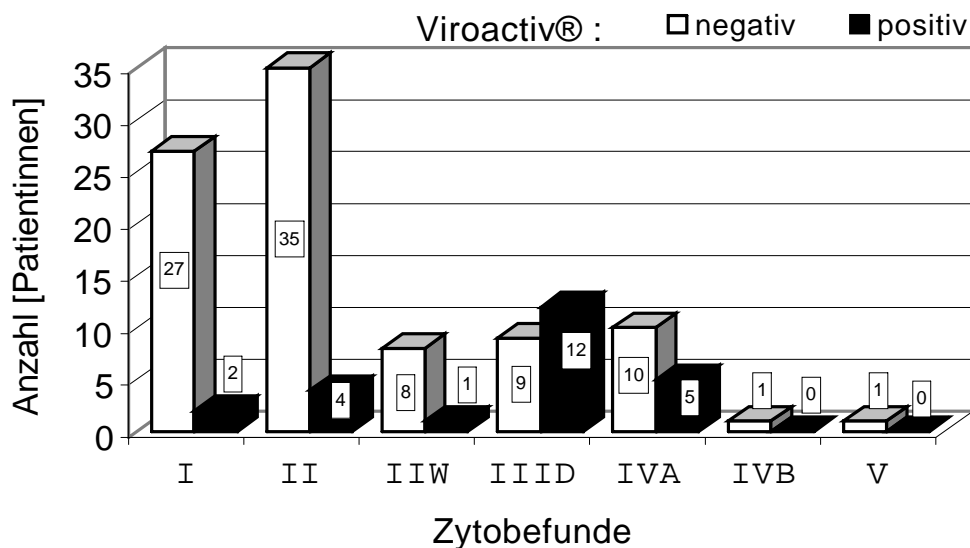


Abbildung XIII: Vergleich von Viroactiv® Test und Zytobefundkonstellation im Gesamtkollektiv

Die Patientinnen mit einem Pap I Befund waren zu 93,10% (n=27) Viroactiv® HPV negativ. Bei den Patientinnen mit einem Pap II Befund waren 89,74% (n=35) HPV negativ. Patientinnen, die einen Pap IIW Befund aufwiesen, waren in 88,89% (n=8) der Fälle HPV negativ. Beim Pap IIID wiesen 42,86% (n=9) der Patientinnen einen negativen HPV- Test auf, beim Pap IVA 42,86% (n=10) und beim Pap IVB und V 100% (n=1). Der Hauptanteil der HPV Positiven fand sich bei den Patientinnen mit einem Pap IIID und einem Pap IVA Befund. 57,14% (n=12) der Patientinnen mit einem IIID Pap- Abstrich waren HPV positiv. Bei den Patientinnen mit einem IVA Befund waren es 33,33% (n=5). Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Fisher Exact Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen **signifikanten** p- Wert von $2,49 \cdot 10^{-4}$ ohne Adjustierung für multiples Testen.

Als nächstes wird der Vergleich der HPV Testergebnisse durch den Hybrid Capture Assay (als Gesamtergebnis und für LR HPV und HR HPV getrennt) und den Viroactiv®Test in drei Kuchendiagrammen dargestellt:

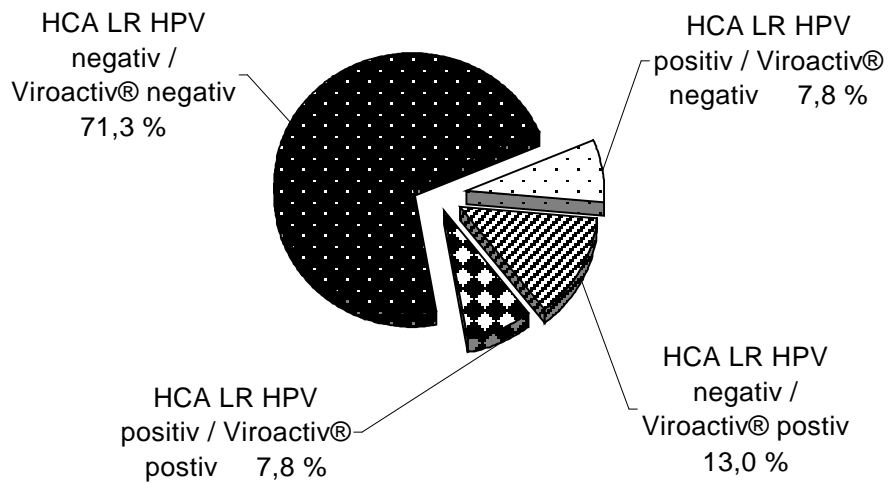


Abbildung XIV: Darstellung der Low Risk HPV Hybrid Capture Assay-Befundverteilung im Vergleich zum Viroactiv® Testergebnis für das Gesamtkollektiv

Beim Vergleich von den LR HPV Untersuchungsergebnissen durch den Hybrid Capture Assay und den HPV- Ergebnissen des Viroactiv® Tests fielen in 9 Fällen (7,8%) beide Tests positiv aus. In 82 Fällen (71,3%) fielen beide Tests negativ aus. In 9 (7,8%) Fällen war das Ergebnis für LR HPV Hybrid Capture Assay positiv während der Viroactiv® Test HPV negativ war. 15 (13%) mal fiel der Viroactiv® Test positiv aus wohingegen der LR HPV Hybrid Capture Assay negativ war. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Fisher Exact Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen **signifikanten** p- Wert von $2,56 \cdot 10^{-3}$ ohne Adjustierung für multiples Testen.

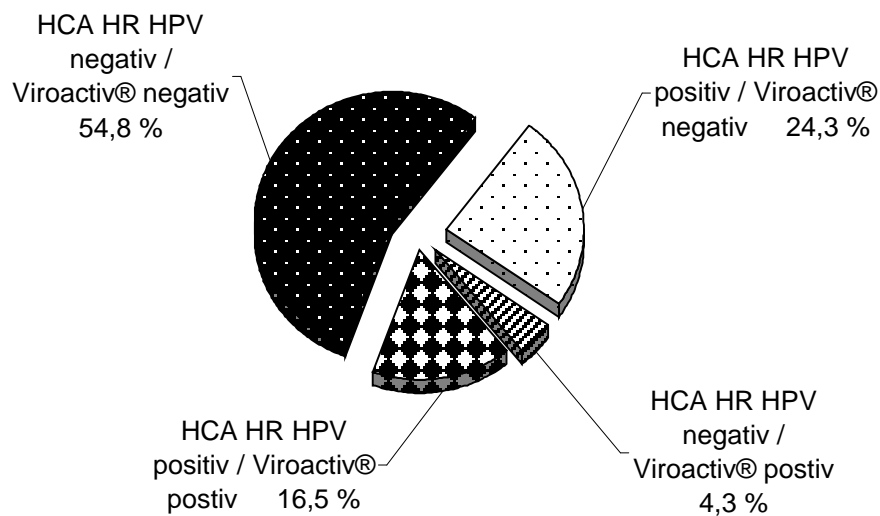


Abbildung XV: Darstellung der High Risk HPV Hybrid Capture Assay-Befundverteilung im Vergleich zum Viroactiv® Testergebnis für das Gesamtkollektiv

Beim Vergleich von HR HPV-Infektion mittels des Hybrid Capture Assays und HPV-Infektiösität mittels des Viroactiv® Tests waren bei 19 (16,5%) Patientinnen beide Tests positiv. Bei 63 (54,8%) Patientinnen fielen beide Tests negativ aus. 28 (24,3%) Patientinnen hatten einen negativen Viroactiv® Test und einen positiven HR HPV Hybrid Capture Assay. 5 (4,3%) Patientinnen hatten einen positiven Viroactiv® Test und ein negatives HR HPV Ergebnis. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Chi- Square Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen **signifikanten** p-Wert von 0,001 ohne Adjustierung für multiples Testen.

Die HPV Gesamtzahl wurde folgendermaßen festgelegt:

Fiel einer der durch den Hybrid Capture Assay ermittelten Tests (HR HPV oder LR HPV) positiv aus, wurde der Test insgesamt als positiv gewertet. Dieses Gesamtergebnis wurde dann mit den Ergebnissen des Viroactiv® Tests verglichen:

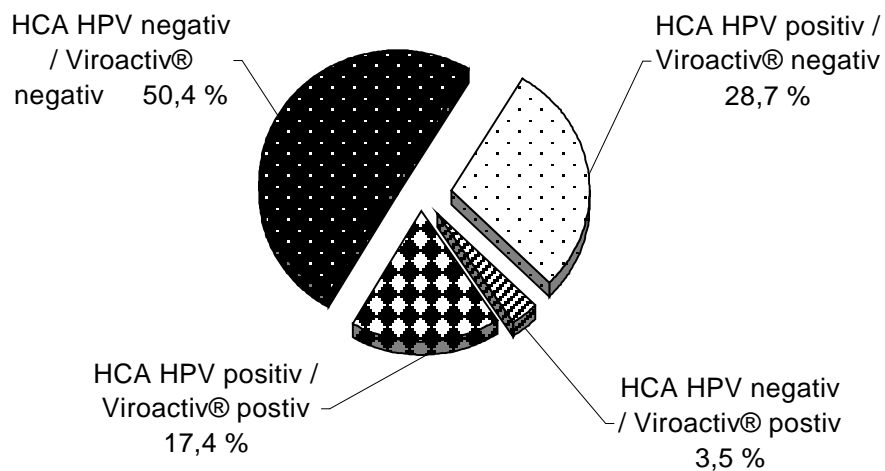


Abbildung XVI: Darstellung der HPV Hybrid Capture Assay- Befundverteilung im Vergleich zum Viroactiv® Testergebnis für das Gesamtkollektiv

In 33 Fällen war das Ergebnis des Viroactiv® Tests negativ und das Gesamtergebnis des Hybrid Capture Assays positiv. In 58 Fällen waren beide Testergebnisse negativ und in 20 Fällen beide positiv. In 4 Fällen war das Ergebnis des Viroactiv® Tests positiv und das Hybrid Capture Assay Ergebnis negativ. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Chi- Square Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen **signifikanten** p- Wert von 0,001 ohne Adjustierung für multiples Testen.

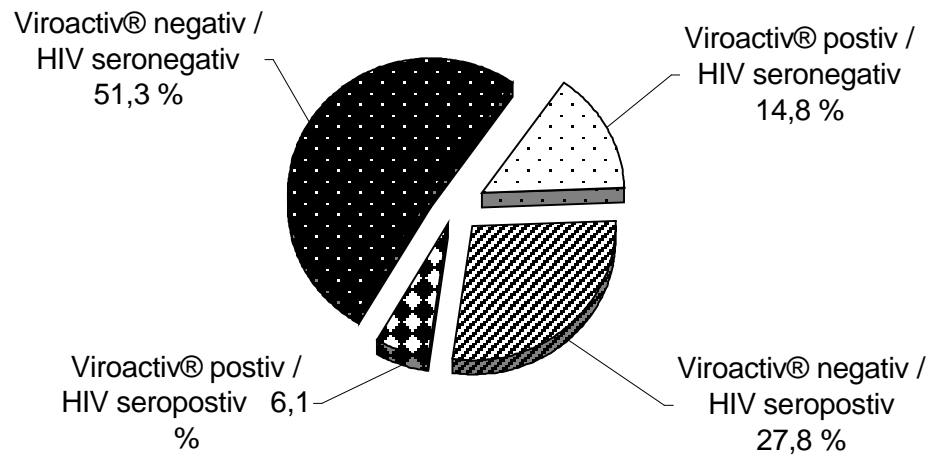


Abbildung XVII: Vergleich des HIV- Status und der HPV Befundung durch den Viroactiv® Test im Gesamtkollektiv

32 (27,8%) Patientinnen wiesen einen seropositiven HIV Test auf hatten aber einen negativen Viroactiv® Test. 7 (6,1%) Patientinnen waren in beiden Tests (HIV / HPV) positiv und 59 (51,3%) Patientinnen waren in beiden Tests negativ. Der Viroactiv® Test fiel bei 17 (14,8%) Patientinnen positiv aus während der HIV Test seronegativ war. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung mit dem Chi- Square Test ergab für $\alpha < 5\%$ einen nicht signifikanten p- Wert von 0,581 ohne Adjustierung für multiples Testen.

Die Abbildungen XVIII , XIXa und XIXb zeigen immunhistochemisch gefärbte Zervixzytologien (Viroactiv® Test).

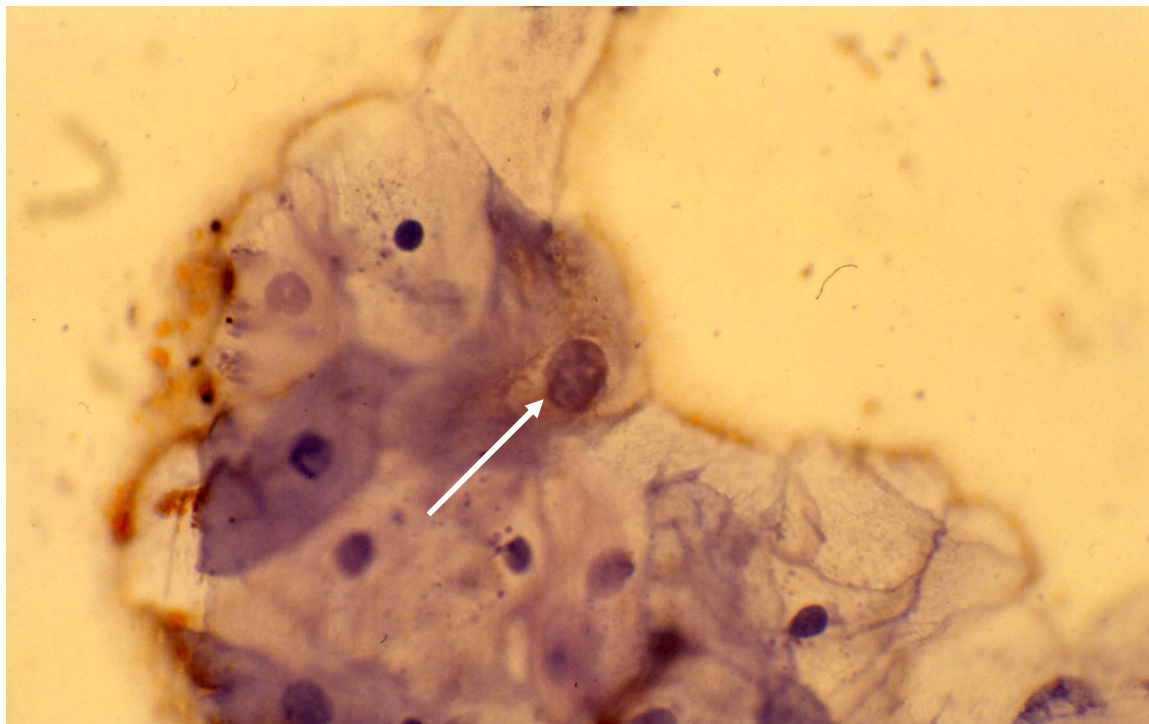


Abbildung XVIII: 31 Jahre alte Patientin mit rezidivierendem PAP IIID (leichte Dyskaryose) ohne Nachweis episomaler HPV-DNA im Zellkern (→). (POX, Vergr.: 25-fach)

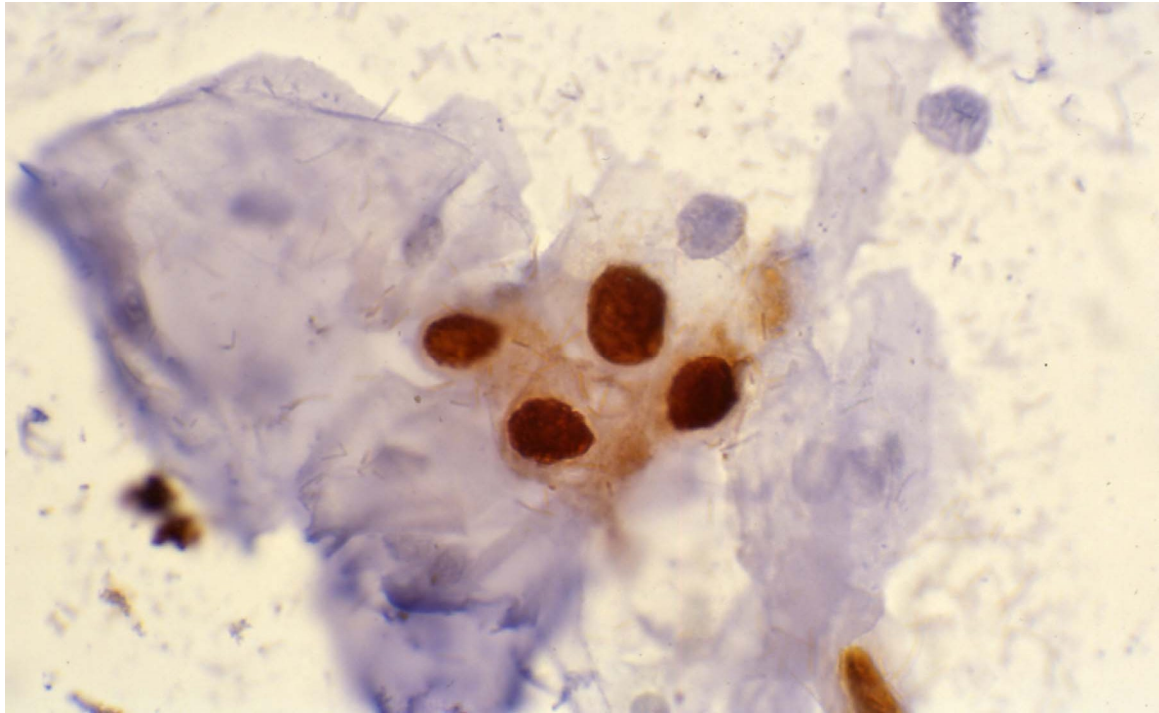


Abbildung XIXa: 30 Jahre alte Patientin mit rezidivierendem PAP IIID (mittelschwere Dyskaryose) mit Nachweis episomaler HPV-DNA im Zellkern.
(POX, Vergr.: 25-fach)

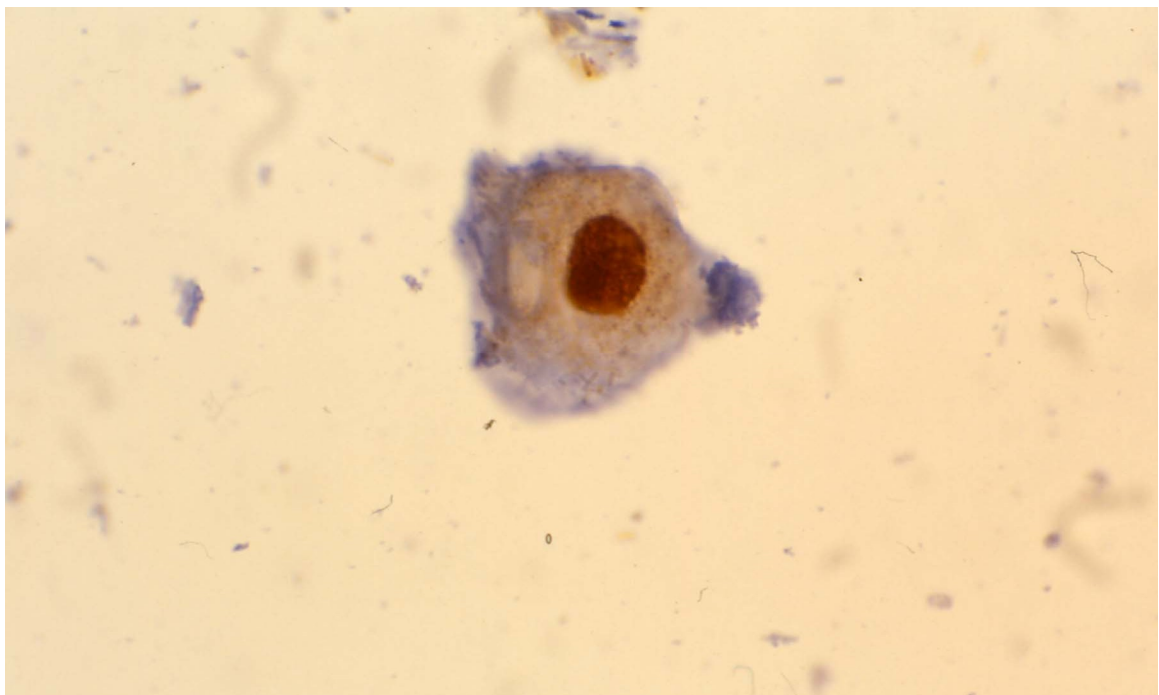


Abbildung XIXb: 30 Jahre alte Patientin mit rezidivierendem PAP IIID (mittelschwere Dyskaryose) mit Nachweis episomaler HPV-DNA im Zellkern.
(POX, Vergr.: 40-fach)

4.4. Statistik

4.4.1. Sensitivität und Spezifität

	Sensitivität	Spezifität
Viroactiv® Test	45%	91%
LR HPV Hybrid Capture Test	29%	91%
HR HPV Hybrid Capture Test	84%	81%
Gesamt Hybrid Capture Test	89%	75%

Tabelle II: Sensitivität und Spezifität

In **Tabelle II** sind die Spezifität und die Sensitivität (für den Viroactiv® Test und den Hybrid Capture Assay, der in LR HPV, HR HPV und Gesamtergebnis HPV aufgeteilt ist) dargestellt. Die Sensitivitäts- und die Spezifitätsberechnung der einzelnen Tests wurde auf die zytologischen Untersuchung, die in dieser Studie als Ausgangsuntersuchungsverfahren diente, bezogen. Der Viroactiv® Test wies eine Sensitivität von 45% und eine Spezifität von 91% auf. Beim LR HPV Hybrid Capture Assay stellte sich eine Sensitivität von 29% und eine Spezifität von 91% dar. Der HR HPV Hybrid Capture Assay hatte in dieser Untersuchung eine Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 81%. Der Gesamt Hybrid Capture Assay, der als positiv definiert wurde, wenn nur einer der Untertests (LR HPV bzw. HR HPV) positiv war, hatte eine Sensitivität von 89% und eine Spezifität von 75%.

4.4.2. Positiver und negativer prädiktiver Wert

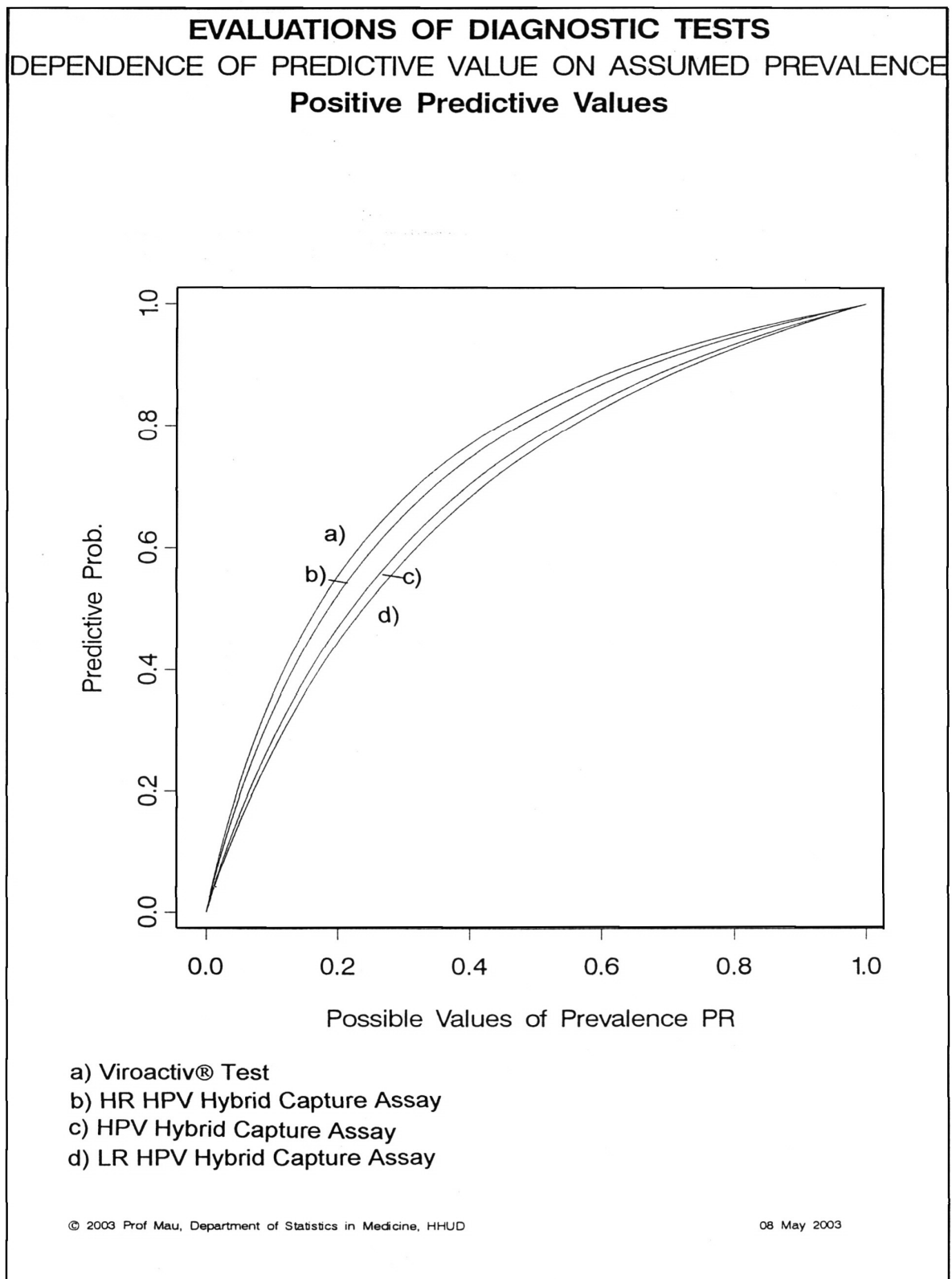
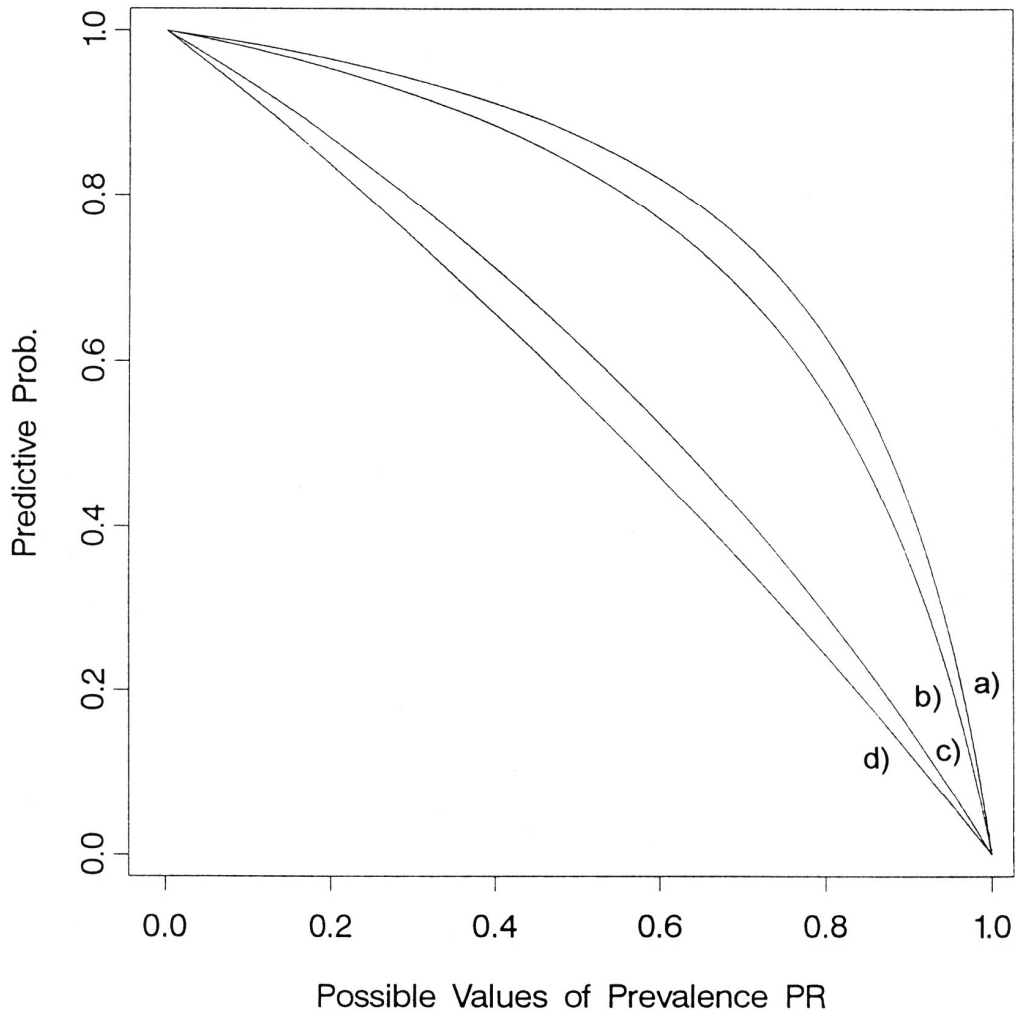


Abbildung XVIII : Positiver prädiktiver Wert

EVALUATIONS OF DIAGNOSTIC TESTS
 DEPENDENCE OF PREDICTIVE VALUE ON ASSUMED PREVALENCE
Negative Predictive Values



- a) HPV Hybrid Capture Assay
- b) HR HPV Hybrid Capture Assay
- c) Viroactiv® Test
- d) LR HPV Hybrid Capture Assay

© 2003 Prof Mau, Department of Statistics in Medicine, HHUD

08 May 2003

Abbildung XIX : Negativer prädiktiver Wert

Die **Abbildungen XVIII und XIX** veranschaulichen graphisch die Ergebnisse der prädiktiven Wertermittlung für den Viroactiv® Test und den Hybrid Capture Assay, dessen Ergebnisse wieder für LR HPV, HR HPV und Gesamt HPV aufgeführt sind. So stellten sich z.B. bei einer Prävalenz von 0,2 (20%) und 0,8 (80%) für den Viroactiv® Test folgende Werte dar:

Bei einer Prävalenz von 0,2 war der ppW 0,56 (56%) und der npW 0,87 (87%). Bei einer Prävalenz von 0,8 war der ppW 0,95 (95%) und der npW 0,29 (29%). Für den Gesamt HPV Hybrid Capture Test ergaben sich bei einer Prävalenz von 0,2 ein ppW von 0,47 und ein npW von 0,96. Bei einer Prävalenz von 0,8 war der ppW 0,93 und der npW 0,63. Für den LR HPV Hybrid Capture Test war bei einer Prävalenz von 0,2 der ppW 0,45 und der npW 0,84. Bei einer Prävalenz von 0,8 war der ppW 0,93 und der npW 0,24. Die Werte für den HR HPV Hybrid Capture Test waren bei einer Prävalenz von 0,2 für den ppW 0,53 und für den npW 0,95. Bei einer Prävalenz von 0,8 war der ppW 0,95 und der npW 0,56.

Diese Daten lassen sich mit folgenden Formeln berechnen:

$$\text{ppW} = \frac{\text{se} \cdot \text{Pr}}{\text{se} \cdot \text{Pr} + (1 - \text{sp}) \cdot (1 - \text{Pr})}$$

$$\text{npW} = \frac{\text{sp} \cdot (1 - \text{Pr})}{\text{sp} \cdot (1 - \text{Pr}) + (1 - \text{se}) \cdot \text{Pr}}$$

In **Abbildung XVIII** verläuft Kurve a) mit den positiven prädiktiven Werten für den Viroactiv® Test am höchsten. Es folgt Kurve b) mit den Werten für den HR HPV Hybrid Capture Assay. Kurve c) mit den Werten für den Gesamt HPV Hybrid Capture Assay verläuft niedriger und am niedrigsten verläuft Kurve d) mit den Werten für den LR HPV Hybrid Capture Assay.

In **Abbildung XIX** verläuft Kurve a) mit den negativen prädiktiven Werten für den Gesamt HPV Hybrid Capture Assay am höchsten. Kurve b), die die negativen prädiktiven Werte des HR HPV Hybrid Capture Assays darstellt verläuft niedriger. Die Werte für den Viroactiv® Test sind auf einer flacheren Kurve c) aufgetragen, und Kurve d), mit den Werten für den LR HPV Hybrid Capture Assay, ist am niedrigsten.

4.4.3. Logistische Regressionsmodelle

LR HPV						
	Parameter Estimate	Standard Error	Pr > Chi-Square	Odds Ratio	Confidence Limits	
					Lower	Upper
Intercpt	2,8557	0,5034	0,0001			
HIV	-1,346	0,5794	0,0202	3,846	1,266	12,658
Viroactiv®	-1,9204	0,5921	0,0012	6,802	2,179	22,727

Tabelle III: Logistisches Regressionsmodell für das Zielkriterium Low Risk HPV

Das logistische Regressionsmodell mit dem Zielkriterium LR HPV und den abhängigen Variablen HIV- Infektiosität und Viroactiv® Test lässt sich wie folgt beschreiben (**Tabelle III**):

Die Chance, dass eine Infektion mit LR HPV vorliegt ist 3,85 (CI 95% [1,27; 12,66]) fach höher, wenn die Patientin HIV positiv ist. Die Chance, dass eine Infektion mit LR HPV vorliegt ist 6,8 (CI 95% [2,18; 22,73]) fach, wenn der Viroactiv® Test positiv ausfällt.

HR HPV						
	Parameter Estimate	Standard Error	Pr > Chi-Square	Odds Ratio	Confidence Limits	
					Lower	Upper
Intercpt	1,8097	0,9654	0,0608			
Alter	0,8332	0,3938	0,0344	2,301	1,083	5,159
Viroactiv®	-1,6572	0,3050	0,0001	5,235	2,985	10
Zytobefund	-1,4888	0,7158	0,0375	4,424	1,118	19,23

Tabelle IV: Logistisches Regressionsmodell für das Zielkriterium High Risk HPV

Für das Zielkriterium HR HPV und die abhängigen Variablen Alter, Zytobefund und Viroactiv® Test lässt sich folgendes aus **Tabelle IV** entnehmen:

Die Chance, dass eine Infektion mit HR HPV vorliegt ist 2,301 (CI 95% [1,083; 5,159]) fach höher, wenn die Patientin sich in einer höheren Altersgruppe (drei Gruppeneinteilung in dieser Studie) befindet, ist 5,24 (CI 95% [2,985; 10]) fach höher, wenn der Viroactiv® Test positiv ausfällt und ist 4,42 (CI 95% [1,12; 19,23]) fach höher je schlechter der Zytobefund ausfällt.

HPV	Parameter Estimate	Standard Error	Pr > Chi-Square	Odds Ratio	Confidence Limits	
					Lower	Upper
Intercpt	1,4645	0,9431	0,1205			
Alter	0,8107	0,3793	0,0325	2,25	1,087	4,886
Viroactiv®	-1,6722	0,3212	0,0001	0,222	1,090	21,277
Zytobefund	-1,5061	0,7416	0,0423	0,188	2,967	10,638

Tabelle V: Logistisches Regressionsmodell für das Zielkriterium HPV

Tabelle V zeigt für das Zielkriterium HPV gesamt und die Einflussvariablen Alter, Viroactiv® Test und Zytobefund folgende Aussagen auf:

Die Chance, dass eine Infektion mit HPV vorliegt ist 2,25 (CI 95% [1,087; 4,886]) fach höher, wenn die Patientin einer höheren Altersgruppe angehört, ist 4,505 (CI 95% [1,09; 21,28]) fach höher, wenn die Patientin einen positiven Viroactiv® Test aufweist, ist 5,319 (CI 95% [2,97; 10,638]) fach höher, wenn die Patientin einer höheren Zytobefundgruppe angehört.

Viroactiv®						
	Parameter Estimate	Standard Error	Pr > Chi-Square	Odds Ratio	Confidence Limits	
					Lower	Upper
Intercpt	2,7336	0,4875	0,0001			
LR HPV	-1,3645	0,6003	0,0230	7,2464	2,5445	24,3902
HR HPV	-1,9820	0,5644	0,0004	3,9063	1,2048	12,9870

Tabelle VI: Logistisches Regressionsmodell für das Zielkriterium Viroactiv® Test

Tabelle VI veranschaulicht für die Zielvariable Viroactiv® Test und die abhängigen Variablen LR HPV und HR HPV folgende Ergebnisse :

Die Chance, dass der Viroactiv® Test positiv ausfällt ist 7,246 (CI 95% [2,544; 24,390]) fach höher, wenn bei der Testung auf LR HPV-Infektiosität der Hybrid Capture Assay positiv ausfällt. Zudem geht aus den Daten hervor, dass die Chance, dass der immunhistochemische Test positiv ausfällt 3,906 (CI 95% [1,205; 12,987]) fach höher ist, wenn die Testung auf HR HPV positiv ausfällt.

5. DISKUSSION

5.1. Einführung

5.1.1. Hintergrund der Untersuchungen

In vielen Studien wurde bereits dargelegt, dass HR Humane Papillomaviren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung zervikaler Dysplasien und des Zervixkarzinoms spielen (Ferrecio et al., 2003; Ikenberg, 2002, Walboomers et al., 1999). Das frühzeitige Erkennen und Therapieren zervikaler Krebsvorstufen im Rahmen von gynäkologischen Vorsorgeuntersuchungen kann die Entstehung des Zervixkarzinoms verhindern. Bei der Krebsvorsorgeuntersuchung ist es besonders wichtig, jene zervikalen Krebsvorstufen rechtzeitig zu erkennen, die sich weiterentwickeln, also zu höhergradigen Stadien progredieren. Daher konzentrieren sich die Untersuchungen der letzten Jahre vor allem auf die Suche nach Faktoren, die ein Progressionsrisiko anzeigen können. Die Schlüsselrolle in der Entwicklung und Progression von zervikalen Dysplasien wird humanen Papillomaviren zugeschrieben. Großangelegte Studien von Schiffman et al. (2000), Clavel et al. (2001) und Schneider et al. (2000) postulieren, dass eine HPV-Testung sensitiver zur Erkennung von hochgradigen zervikalen Läsionen sei als die übliche Routinezytologie. Sie räumen aber auch ein, dass die geringere Spezifität im Gegensatz zur Zytologie die HPV-Testung als primäres Screeningverfahren fragwürdig erscheinen lässt. Doch nur ein sehr geringer Anteil an HPV-Infektionen führt zum Karzinom. Von Knebel Doeberitz schreibt in seiner Untersuchung 1992 (b), dass das virale Genom beim Zervixkarzinom in der Regel in Wirtszellchromosomen integriert vorliegt, während es in frühen Präneoplasien als unabhängiges episomales Molekül repliziert wird. Das normalerweise zirkulär vorliegende HPV bricht dabei bevorzugt im E1/E2 Bereich auf und lagert sich in die chromosomale DNA der infizierten Zelle ein (Richart et al., 1998). Mit dem von der Firma Virofem entwickelten monoklonalen Antikörper (Viroactiv® Test) werden nur episomal vorliegende L1

Virusproteine nachgewiesen. Diese liegen in einem aktiven, infektiösen Stadium vor und sind in der Zytologie an routinemäßig erstellten Präparaten darstellbar.

5.1.2. Untersuchungsmethodik

Das Hauptziel dieser Arbeit ist in Form einer retrospektiven Studie die Untersuchung eines neuen immunhistochemischen HPV Nachweisverfahrens (Viroactiv® Test). Dazu soll der neue Nachweistest mit einem anderen etablierten HPV DNA Nachweistest (Hybrid Capture Assay) und mit der morphologischen Beurteilung von Zellabstrichpräparaten (Papanicolaou Test) verglichen werden.

Der Pap Test dient in dieser Studie als Ausgangsuntersuchungsverfahren. Er gehört seit 1971 zum Früherkennungsprogramm der gesetzlichen Krebsvorsorge und wird von jedem Gynäkologen für Frauen ab dem 20. Lebensjahr jährlich angeboten und durchgeführt. Das Routine- Vorsorgeprogramm basiert auf der Inspektion und der zytologischen Abstrichuntersuchung (Pap Test), wobei im Einzelfall eine Gewebeprobeentnahme (Histologie) zur Diagnosesicherung führt (Küppers und Schnürch, 1997). Dieser standardmäßig durchgeführten zytologischen Abstrichuntersuchung vom Gebärmutterhals verdankt man eine deutliche Abnahme der Neuerkrankungs- und Sterberate am Zervixkarzinom (ACOG, 2003; Schneider et al., 2001; Richart et al., 1998). Eddy bewertet (1990) die Zervixzytologie in vielerlei Hinsicht als ein gutes Screeningtestverfahren. Die oft kritisierte Rate an falsch negativen Ergebnissen der Zytologie kann durch regelmäßige Testwiederholungen erheblich reduziert werden (Sensitivität von 93% wird bei einer Abstrichserie von 4 Abstrichuntersuchungen erreicht) (Kreienberg, 2001). Da der Entwicklungszeitraum von einer prämaligen Läsion zu einem Zervixkarzinom viele Jahre bedarf, ist durch wiederholte Testuntersuchungen die Möglichkeit groß, die Rate an falsch negativen Ergebnissen deutlich zu senken und eine krankhafte Veränderung der Cervix uteri frühzeitig festzustellen (ACOG, 2003).

Als neues HPV Nachweisverfahren wird der Viroactiv® Test von der Firma Virofem aus Wiesbaden untersucht. Als Vergleichsverfahren zum HPV Nachweis wird der Hybrid- Capture- Test durchgeführt. Für eine HPV- Testung im Routineeinsatz

erscheint im Moment der Hybrid- Capture- Test (HCA) gut geeignet. Der HCA weist 13 HR und 5 LR HPV- Typen nach (Wright et al., 1998). Beim HCA besteht eine große Robustheit gegenüber Variationen bei der Probeentnahme und Lagerung, die Sensitivität ist für alle nachzuweisenden HPV- Typen gleich und der Cut- off- Wert wird so eingestellt, dass sehr geringe Infektionen fraglicher Wertigkeit nicht erfasst werden. Als nachteilig erscheinen beim HC- Verfahren die mögliche Kreuzreaktion zwischen den HR humanen Papillomaviren und den LR Proben bei hoher Kopienzahl und das Fehlen einiger HPV- Typen im HR Probengemisch. Der Hybrid Capture Assay ist allerdings der einzige Test, der von der amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA die Zulassung für den Routineeinsatz bekommen hat (Schneider et al., 2002).

5.2. Darstellung und Bewertung der Ergebnisse

5.2.1. Altersprofil

Das durchschnittliche Alter der 115 Patientinnen beträgt 35 Jahre. Wobei sich 46,96% der Patientinnen in einem Alter zwischen 26 und 35 Jahren befinden. 60,38% der durch den HCA HPV positiv getesteten Patientinnen sind zwischen 26 und 35 Jahre alt. Es ist bekannt, dass gerade in dieser Altersgruppe die höchste Prävalenz für HPV Nachweise besteht (Ho et al., 1998). So sind auch bei unseren Untersuchungen von allen HCA HPV getesteten Patientinnen mehr als die Hälfte zwischen 26 und 35 Jahre alt. Die in dieser Arbeit vorgefundene Altersstruktur in den einzelnen Patientengruppen entspricht anderen Untersuchungen zum HPV- DANN- Nachweis mit unterschiedlichen Fragestellungen (Schneider et al., 2000; Manos et al., 1999).

5.2.2. HPV- Nachweis mittels Hybrid Capture Assay

Bei 46,09% der untersuchten Frauen in dieser Arbeit ist HPV nachzuweisen. Dabei wird in 15,65 % der 115 Fälle LR HPV und in 40,87% der 115 Patientinnen HR HPV nachgewiesen (Mischinfektionen werden berücksichtigt). Carvalho et al. (2003) gibt in seiner Untersuchung mit ähnlichem Versuchsaufbau nur einem größeren Patientenkollektiv (n=1055) eine Gesamt HPV- Durchseuchung von 48,3% darunter eine LR HPV Nachweisrate von 11,8% und eine HR HPV Nachweisrate von 52,7% an. Diese Daten stimmen recht gut mit unseren Untersuchungsbefunden überein. Dagegen beschreibt Schneider et al. (2000) ein nicht selektiertes, zahlenmäßig fast 41fach so großes Routinekollektiv (n=4671), in dem der Nachweis von HR HPV bei 7,8% liegt. In ähnlicher Größenordnung bewegen sich die Angaben von Ratnam et al. (2000), der bei Routineuntersuchungen in einem altersgemischten Patientenkollektiv (n=2098) eine Durchseuchung mit HR humanen Papillomaviren in 10,8% der Fälle nachweisen kann. In einer Studie von Petry et al. (2003) ist der Anteil der HR HPV positiven Patientinnen mit 6,4% etwas niedriger als bei Schneider. Diese geringe Prävalenz lässt sich dadurch erklären, dass Petry et al. (2003) nur Frauen ab 30 Jahren in seine Untersuchungen aufgenommen hat, und die Anzahl der HPV- Infektionen ab 30 Jahren deutlich abnimmt (Burk et al., 1996). Weitere Ursachen für die deutliche Differenz der Untersuchungsergebnisse könnten im selektierten Patientengut der Dysplasiesprechstunde der Düsseldorfer Universitätsfrauenklinik im Gegensatz zu Kollektiven aus Routineuntersuchungen zu finden sein. Denn auch bei Studien anderer selektierter Kollektive zeigten sich deutlich höhere Prävalenzen von HR HPV. Manos et al. (1999) gibt eine Prävalenz von fast 40% für HR HPV an. In der Studie von Solomon et al. (2001) wird sogar eine HR HPV Durchseuchung von fast 51% beschrieben. Das Patientinnenkollektiv unserer Studie setzt sich aus vom niedergelassenen Gynäkologen überwiesenen Patientinnen mit auffälligen zytologischen Befunden zur weiteren Abklärung und gegebenenfalls Therapie zusammen. Die Nachsorge wird in den meisten Fällen wieder vom überweisenden Gynäkologen übernommen. Eine andere Ursache für die voneinander abweichenden Untersuchungsergebnisse könnte in der Nichtübereinstimmung der HPV- Nachweissysteme liegen (PCR- basiertes Verfahren, Hybrid Capture Test).

Signifikante Werte zeigen sich auch bei der Betrachtung der Altersverteilung der Patientinnen in Bezug auf die HPV Test Befundung. Fast zweidrittel der HCA HPV positiven Patientinnen ist zwischen 26 und 35 Jahre alt. Knapp unter 80% liegt der Anteil der 115 Patientinnen, die in der Altersgruppe der 17-35 jährigen mit einem positiven HCA HPV Befund vertreten sind. Negative HCA HPV Testergebnisse sind in mehr als der Hälfte der Fälle in der älteren Patientengruppe zu finden. Diese Daten decken sich nicht mit den Untersuchungsergebnissen von Melsheimer et al. (2003), der bei einem selektierten Risikokollektiv ein Durchschnittsalter von HPV infizierten Patientinnen von 36,5 Jahren angibt. Der höhere Altersdurchschnitt in Melsheimers Untersuchung könnte mit den bei allen untersuchten Frauen vorliegenden Zervixepithelveränderungen in Zusammenhang stehen, die erst bei Frauen um die 35 Jahre gehäuft auftreten. In unserem Kollektiv hat die Hälfte der Frauen einen unauffälligen Zervixabstrich (Pap I und II). Diese Diskrepanzen erklären sich dadurch, dass in der vorliegenden Untersuchung und bei Melsheimer das Durchschnittsalter der untersuchten Frauen im Gegensatz zu Literaturangaben, in denen sich die meisten HPV positiven Patientinnen eher zahlenmäßig recht stark in den jüngeren Altersklassen finden (Richart et al., 1998; Ho et al., 1998), recht hoch ist. Clavel et al. (1998) gibt in seiner Studie mit 1028 unselektierten Frauen ein HPV-Nachweispeak in der dritten Altersdekade an.

Sehr ähnliche Altersdaten im Vergleich zu unserer Studie finden sich allerdings in einer Untersuchung von Witt et al. (2003), bei der 71,8% der HPV positiven Patientinnen aus einem 280 Frauen umfassenden Routinekollektiv zwischen 20 und 39 Jahren sind.

Differenziert man den HCA HPV- Nachweis in unserem Kollektiv nach Ergebnissen von auffälligen und unauffälligen Zytologien (Pap I+II +IIW/ Pap >IIW) stellen sich in dieser Untersuchung folgende Ergebnisse dar: Der Hauptanteil der positiven HCA HPV Befunde findet sich signifikant mit 57,6% bei Patientinnen, die eine auffällige Abstrichuntersuchung aufweisen (IIID, IVA, IVB und V). Vergleichbare Daten liefert auch die Untersuchung von Petry et al. (2003), die auch die Zytologie als Ausgangsuntersuchung und den HCA als HPV- Nachweisverfahren heranzieht. 57,1% der Patientinnen mit auffällig veränderten Abstrichuntersuchungen haben auch in dieser groß angelegten Untersuchung (n=8083) positive HCA HPV Befunde.

Signifikant stellen sich die Untersuchungsergebnisse auch bei der Aufspaltung in LR und HR HPV Befundverteilung dar. Die HCA positiven LR Befunde sind zum größten Teil bei Patientinnen mit unauffälligen bis geringgradig veränderten zytologischen Befunden zu finden. Dagegen sind die HCA positiven HR Befunde hauptsächlich bei schweren Dysplasien vertreten. Diese Ergebnisse werden von Angaben in der Literatur gestützt, in denen die Kernaussage ist, dass HPV positive Frauen häufiger zytologisch auffällige Befunde aufweisen als Frauen mit negativem Virusnachweis. Wir schließen daraus, dass mit HPV infiziertes Zervixgewebe zu dysplastischen Veränderungen neigt und bei Hinzutreten weiterer Risikofaktoren maligne entarten kann.

5.2.3. HPV- Nachweis mittels Viroactiv® Test

Fast 80% der Patientinnen mit einem positiven Viroactiv® HPV Befund haben gleichzeitig einen unauffälligen oder geringgradig veränderten zytologischen Befund. Beim Vergleich von HCA und Viroactiv® HPV Befundung stellt sich eine signifikante Übereinstimmung von HCA LR HPV Befundung und Viroactiv HPV Befundung dar. Übereinstimmend negative HPV Befunde werden in 71,3% der Fälle aufgezeigt. Übereinstimmend positive HPV Ergebnisse stellen sich in 7,8% der Fälle dar. In 20,8% der Fälle gibt es keine übereinstimmenden HPV Befunde.

Beim Vergleich von HCA HR - und Viroactiv HPV Befunden stellt sich nur in 50,4% der Fälle eine übereinstimmend negative Befundung dar. Übereinstimmend positiv HPV befundet werden 16,5% der Patientinnen. Bei 24,3% der Patientinnen wird durch den HCA HPV nachgewiesen, während der Viroactiv Test keinen HPV Nachweis erbringt. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Melsheimer et al. (2003) überein. Melsheimer untersucht innerhalb eines Jahres 74 Patientinnen mit zytologisch und histologisch gesicherten Zervixdysplasien. Das Ziel seiner Studie ist die Untersuchung, ob die Expression des L1 Hüllproteins des humanen Papillomavirus vom HPV Typ oder dem Schweregrad einer zervikalen Veränderung beeinflusst wird. Zum HPV L1- DNA Nachweis verwendet er die PCR (MY 09/11) und zum L1 Hüllproteinnachweis nutzt er monoklonale Antikörper (T31 und T16). Er erhält folgende Ergebnisse: Bei der HPV Typisierung mittels HPV DNA Analyse

(PCR) wird HPV 16 fast doppelt so häufig in schwergradig- als in leichtgradig veränderten Epithelzellen nachgewiesen. Die Prävalenz von HR HPV ist signifikant höher in schwergradig- (HSIL) als in leichtgradig veränderten (LSIL) Epithelzellen. Diese Ergebnisse werden auch von Manos et al. (1999) in ähnlicher Weise beschrieben. Die immunocytochemische Färbung mit den monoklonalen Antikörpern T31 und T16 zeigt eine zahlenmäßig höhere positive Färbung in den leichtgradig veränderten Läsionen als in den schweren Läsionen. Diese Ergebnisse verdeutlichen eine statistisch signifikante Reduktion des L1 Hüllproteinnachweises in HPV 16 DNA- positiven und HR HPV DNA- positiven hochgradig veränderten Epithelzellläsionen. Diese Aussage wird von einer Untersuchung von Klaes et al. (1999) unterstützt, in der in fast 90% der invasiven Karzinome Papillomavirusonkogenentranskripte in ihr Zellgenom integriert haben. Normale Zervixepithelien oder CIN I weisen dagegen keine Integrate auf. In unserer Studie wird zum HPV DNA Nachweis der Hybrid Capture Test verwendet. Als Ausgangsuntersuchung dient der zytologische Abstrich. Ein möglicher Erklärungsansatz für die verminderte HPV L1 Hüllproteinexpression mag die Integration von HPV Onkogenen in das Wirtszellgenom mit Zerstörung oder Verlust des L1 Hüllproteins sein. Diese Daten veranschaulichen, dass immunhistochemische Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern, die gegen die L1 Hüllproteine der humanen Papillomaviren gerichtet sind, einen ganz anderen Nachweis erbringen als HPV DNA Suchtests. Auch diese Aussage ist in der Studie von Melsheimer et al. durch folgende Daten belegt: bei schwergradig veränderten Zellläsionen besteht eine deutliche Differenz zwischen L1 Hüllproteinenerkennung und L1 DNA- Erkennung von 59,52%. Die Differenz beider Testverfahren wird bei geringgradigen Zellveränderungen auf 15,63% reduziert. Das lässt in Übereinstimmung mit unseren Daten den Schluss zu, dass die Untersuchungsergebnisse dieser unterschiedlichen Testverfahren nicht miteinander verglichen werden können, da sie eine ganz andere Aussage haben. Beim HCA wird DNA des humanen Papillomavirus nachgewiesen, die auf jeden Fall bei einer Infektion mit dem Virus nachgewiesen wird. Bei dem immunhistochemischen Suchtest wird ein Hüllprotein des Virus nachgewiesen, dass sich wahrscheinlich nur bei einer aktiven Infektion, die üblicherweise noch keine hochgradigen Zelldysplasien aufweist, findet.

Zum Auffinden von hochgradigen Läsionen, bei denen das Virusgenom bereits in das Wirtszellgenom integriert ist, ist der immunhistochemische Nachweis vermutlich nicht geeignet

5.2.4. HIV- Status

In unserer Untersuchung sind knapp 34% der Patientinnen HIV positiv. Bei allen unseren durchgeführten Untersuchungen zeigen sich keine signifikanten Verteilungen im HIV seropositiven Patientenkollektiv. So findet sich in unseren Untersuchungen im Gegensatz zu Angaben aus der Literatur (Davis et al., 2001) ein höherer Anteil HIV seropositiver Patientinnen in zytologisch unauffälligen (Pap I+II) getesteten Patientinnen. Dieser Befund könnte für eine möglicherweise noch nicht stark eingeschränkte zelluläre Abwehrreaktion sprechen. Es wäre auch möglich, dass bei diesen Frauen der Einsatz einer antiretroviralen Therapie zu einer wenig eingeschränkten Abwehrreaktion geführt hat. Zusätzlich ist die unauffällige Zytologie ein Hinweis auf das Nichtzutreffen häufig vergesellschafteter Risiken aus Prostitution oder Promiskuität- eventuell handelt es sich sogar um eine Untergruppe, die zur Verhütung einer Infektionsübertragung nur kondomgeschützten oder gar keinen Geschlechtsverkehr hat. Diese Hypothesen müssten durch weitere Untersuchungen vergleichbarer Untergruppen überprüft werden. Ein Drittel unserer Patientinnen (n=39) ist zum Untersuchungszeitpunkt HIV seropositiv. Davon sind 51,28% HCA HPV- positiv, d.h. im Vergleich zu den oben genannten ``Routinekollektiven`` ist der Anteil HPV- positiver Frauen um das 5-6 fache deutlich erhöht. Das Ergebnis entspricht den Literaturangaben über Zusammenhänge zwischen HPV Nachweis und HIV Status.

5.2.5. Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert

Für den Hybrid Capture Test beträgt die Sensitivität in dieser Studie 89%, die Spezifität liegt bei 75% und der negative Vorhersagewert bei 96,4%. Vergleichbare Daten gibt auch Morin et al. (2001) in ihrer Studie für ein 360 Patientinnen umfassendes Risikokollektiv an. Sie berichtet für den Hybrid Capture Test von einer Sensitivität von 89,5%, von einer Spezifität von 73,9% und von einem negativen Vorhersagewert von 99,2%.

In unserer Studie zeigt sich der Hybrid Capture Test als deutlich sensitiver mit 89% im Vergleich zum Viroactiv Test mit 45%. Wobei, wie schon oben ausgeführt, die beiden Testsysteme unterschiedliche Befunde nachweisen und daher nicht direkt miteinander verglichen werden können. Generell erscheint der Vergleich unterschiedlicher Studien recht schwierig, da unterschiedliche HPV DNA-Nachweisverfahren, unterschiedliche Klassifikationssysteme für neoplastische Läsionen, unterschiedliche Patientenkollektivgrößen, unterschiedliche Selektionskriterien für die Patientenkollektive für die einzelnen Studien angewendet werden. Dies ist bei der Interpretation der unterschiedlichen Daten zu berücksichtigen.

5.3. Klinische Schlussfolgerung

Die von der Firma Virofem entwickelten Antikörper, die hier in Form des Viroactiv® Tests untersucht werden, richten sich gegen die L1 Hüllproteine humaner Papillomaviren. Diese Hüllproteine, die nur bei aktiven und somit übertragbaren Infektionen exprimiert werden, lassen sich wie unsere Untersuchungsergebnisse zeigen bei zunehmenden zervikalen Zellveränderungen signifikant weniger häufig nachweisen als bei geringen Zellläsionen. Eine Integration von Virusgenen in das Wirtsgenom könnte einen Verlust oder eine Zerstörung des L1 Hüllproteins begründen. Ebenso könnte ein gestörter Entwicklungsprozeß des L1 Proteins in einer höhergradig entdifferenzierten Zelldysplasie begründet sein. Melsheimer et al. (2003)

wirft in seinen Untersuchungen als zusätzliche Frage auf, ob möglicherweise die Virushüllproteine als Hauptangriffsort der zellulären Immunabwehr dienen und mit einem Verlust dieser Virusantigene eine reduzierte Immunantwort das Resultat ist. Diese Vermutungen bedürfen allerdings weiterer und genauerer Untersuchungen. Zu unserer Studie lässt sich sagen, dass Viroactiv® als monoklonaler Antikörper möglicherweise eine Rolle zur Erkennung einer aktiven Infektion mit humanen Papillomaviren darstellt. Allerdings erscheint der Einsatz für höhergradige Dysplasien und Karzinome, die mit der Integration der viralen DNA in das zelluläre Wirtsgenom einhergehen, eher ungeeignet. Es ist möglich, dass mit dem Viroactiv® Test eine Vorhersage über den weiteren Verlauf einer zervikalen Dysplasie zu machen ist. Es sollte daher in groß angelegten Follow-up-Studien die Signifikanz und der Wert für den klinischen Alltag eines positiven Antikörperrnachweises untersucht werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In vielen Studien wurde gezeigt, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von HPV und dem biologischen Verhalten zervikaler Krebsvorstufen gibt. Nur ein geringer Teil dieser zervikalen Präneoplasien progrediert zum Zervixkarzinom. Es ist die Aufgabe von Vorsorgeuntersuchungen diese Fälle zu erkennen und rechtzeitig zu therapieren. Zusätzlich zur jährlichen Abstrichuntersuchung wird eine Infektionstestung für HPV diskutiert, für die der HCA als bisher einziges HPV Nachweisverfahren die Zulassung von der amerikanischen Gesundheitsbehörde bekommen hat.

Gegenstand dieser retrospektiven Studie war die Analyse des Zusammenhangs zwischen HPV- Status, durch zwei unterschiedliche Testverfahren ermittelt, und der morphologischen Zellbeurteilung. Von 115 Frauen wurden die Ergebnisse des HCA, des Viroactiv® Tests und die zytologischen Abstrichpräparate, nach Papanicolaou gefärbt, miteinander verglichen. Virusnegativ getestete Frauen hatten überwiegend zytologisch unauffällige Befunde, während HPV positiv getestete Frauen signifikant häufiger verdächtige zytologische Ergebnisse aufwiesen. Wir stellten fest, dass ein direkter Vergleich der zwei unterschiedlichen HPV Nachweisverfahren nicht möglich ist. Der Viroactiv® Test richtet sich gegen die L1 Hüllproteine humaner Papillomaviren, die nur bei aktiven Infektionen exprimiert werden. Diese Hüllproteine lassen sich, wie unsere Untersuchungsergebnisse gezeigt haben, bei höhergradigen zervikalen Zellveränderungen signifikant weniger häufig nachweisen, als bei geringgradigen Zellläsionen. Mit dem HCA wird DNA des HPV nachgewiesen, ohne zu differenzieren, ob eine episomale Infektion vorliegt oder ob eine HPV- DNA-Integration im Wirtsgenom stattgefunden hat. Es ist möglich, dass mit dem Viroactiv® Test ein selektiver Nachweis einer aktiven Infektion mit HPV nachweisbar ist und somit eine Aussage über den weiteren Verlauf einer zervikalen Dysplasie gemacht werden kann. Welche Relevanz ein positiver Viroactiv® Test für den klinischen Alltag hat sollte in groß angelegten Follow- up- Studien untersucht werden. Die vorliegenden Daten lassen allerdings nicht erkennen, dass der Viroactiv® Test als Progressionsmarker eingesetzt werden kann.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ACOG PRACTICE BULLETIN NO. 45

Cervical Cytology Screening

American College of Obstetricians and Gynecologists

Obstet Gynecol 2003; 102: 417-427

BALTZER J

Zervixkarzinom Diagnostische Verfahren und Therapie der Früh- und Vorstadien

Onkologe 2001; 7: 827-841

BERUMEN J, CASAS L, SEGURA E, AMEZCUA JL, GARCIA-CARRANCA A

Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical

carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes

Int J Cancer 1994; 56: 640-645

BOSCH FX, LORINCZ A, MUNOZ N, MEIJER CJLM, SHAH KV

The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer

J Clin Pathol 2002; 55: 244-265

BOSHART M, GISSMANN L, IKENBERG H, KLEINHEINZ A, SCHEURLLEN W, zur
HAUSEN H

A new type of papillomavirus DNA, ist presence in genital cancer biopsies and in cell
lines derived from cervical cancer

EMBO J 1984; 3:1151-1157

BOYLE P, MAISOONEUVE P, AUTIER P

Update on cancer control in women

Int J Gynecol Oncol 2000; 70: 263-304

BURK RD

Human papillomavirus and the risk of cervical cancer

Hosp Pract 1999; 34: 103-111

BURK RD, KELLY P, FELDMAN J, BROMBERG J, VERMUND SH, DEHOVITZ JA,
LANDESMAN SH

Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is
independent of other risk factors

Sex Transm Dis 1996; 23: 333-341

CARVALHO MO, ALMEIDA RW, LEITE FM, FELLOWS IB, TEIXEIRA MH,
OLIVEIRA LH, CAVALCANTI SM

Detection of human papillomavirus DN by the hybrid capture assay

Braz J Infect Dis 2003; 7: 121-125

CASTANEDA MS, LAZCANO E, SALMERON J, HERNANDEZ M, YUNES E, ESTRADA R, BERUMEN J
2001; Asian-American and European HPV- 16 variant subtypes, associated to cervical neoplasia. A multicentric case- control study in Mexico. 19th International Papillomavirus Conference, Florianapolis (Brazil)

CASTLE PE, LORINCZ AT, MIELZYNSKA- LOHNAS I, SCOTT DR, GLASS AG, SHERMAN ME, SCHUSSLER JE, SCHIFFMAN M
Results of human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay are reproducible
J Clin Microbiol 2002; 40: 1088-1090

CLAVEL C, BORY JP, MASURE M, DUVAL-BINNINGER I, PUTAUD I, LORENZATO M, QUEREUX C, BIREMBAUT P
Comparative Analysis Of Human Papillomavirus Detection By Hybrid Capture Assay And Routine Cytologic Screening To Detect High- Grade Cervical Lesions
Int J Cancer 1998; 75: 525-528

CLAVEL C, MASURE M, BORY JP, PUTAUD I, MANGEONJEAN C, LORENZATO MNP, GABRIEL R, QUEREUX C, BIREMBAUT P
Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women
Br J Cancer 1999; 80(9): 1306-1311

CLAVEL C, MASURE M, BORY JP, PUTAUD I, MANGEONJEAN C, LORENZATO MNP, GABRIEL R, QUEREUX C, BIREMBAUT P
Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high- grade cervical lesions: a study of 7932 women
Br J Cancer 2001; 84: 1616-1623

CRAWFORD LV, CRAWFORD EM
A comparative study of polyoma and papilloma viruses
Virology 1963; 21: 258-263

DAVIS AT, CHAKRABORTY H, FLOWERS L, MOSUNJAC MB
Cervical Dysplasia in Women Infected with the Human Immunodeficiency Virus (HIV): A Correlation with HIV Viral Load and CD4+ Count
Gynecol Oncol 2001; 80: 350-354

DGGG EMPFEHLUNG
AG FÜR INFEKTIONEN UND INFEKTIONSIMMUNOLOGIE IN DER Gynäkologie und GEBURTSHILFE DER DGGG (AAGII), EUROPEAN SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES IN OBSTETRICS AND GYNAEKOLOGY (ESIDOG), INTERNATIONAL INFECTIOUS DISEASE SOCIETY IN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY- EUROPE (I-IDSOG-EUROPE), IN ZUSAMMENARBEIT MIT DER DEUTSCHEN STD- GESELLSCHAFT (DSTDG), DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR UROLOGIE (DGU) UND DER AG ZERVIXPATHOLOGIE UND KOLPOSKOPIE DER DGGG
Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie der HPV- Infektion des weiblichen Genitale
Frauenarzt 2001; 42: 1171-1175

de VILLIERS EM
Papillomavirus and HPV- Typing
Clin Derma 1997; 15: 199-206

DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT E.V., DEUTSCHE KREBSHILFE E.V.
Stellungnahme zur Früherkennung der Karzinome der Zervix, Vulva, Vagina
Frauenarzt 2001; 42(10): 1167-1170

DÜRST M, GISSMANN L, IKENBERG H, zur HAUSEN H
A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy
samples from different geographic regions
Proc Nat Acad Sci USA 1983; 80: 3812-3815

EDDY DM
Screening for cervical cancer
Ann Intern Med 1990; 113: 214-226

FERRECCIO C, BRATTI MC, SHERMAN ME, WACHOLDER S, HILDESHEIM A,
BURK RD, HUTCHINSON M, ALFARO M, GREENBERG MD, MORALES J,
RODRIGUEZ AC, SCHUSSLER J, EKLUND C, MARSHALL G, SCHIFFMAN M
A comparison of single and combined visual, cytologic, and virologic tests as
screening strategies in a region at high risk of cervical cancer
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; 12: 815-823

FISCHER U, RAPTIS G, GEßNER W, ROSCHLAU U, DRESSEL K, BILEK K, HORN
LC
Epidemiologie und formale Pathogenese des Zervixkarzinoms
Zentralbl Gynakol 2001; 123: 198-205

GISSMANN L, DIEHL V, SCHULTZ-COULON H, zur HAUSEN H
Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from
the laryngeal papilloma
J Virol 1980; 44: 393-400

GISSMANN L, zur HAUSEN H
Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*condylomata
acuminata*)
Int J Cancer 1982; 25: 605-609

HABEDANK S, SCHEWE C, RIZZELLO M, DIETEL M, HAUPTMANN S
Detection of Active Human Papilloma Virus Infection by Immunohistochemistry
Unveröffentlichte Befunde

HARMS V
Biomathematik Statistik und Dokumentation
Harms, Kiel 1998

HERRERO R, HILDESHEIM A, BRATTI C, SHERMAN E, HUTCHINSON M,
MORALES J, BALMACEDA I, GREENBERG D, ALFARO M, BURK RD,
WACHOLDER S, PLUMMER M, SCHIFFMANN M
Population-Based Study of Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia
in Rural Costa Rica
J Natl Cancer Inst 2000; 92(6): 464-474

HILGARTH M

Münchener Nomenklatur II für die gynäkologische Zytodiagnostik
Frauenarzt 2001; 39: 392-393

HILGERS R-D, BAUER P, SCHEIBER V

Einführung in die Medizinische Statistik
Springer, Berlin 2003; 81-86

HO GY, BIERMAN R, BEARDSLEY L, CHANG CJ, BURK RD

Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women
N Engl J Med 1998; 338: 423-428

HOWLEY PM, MÜNGER K, WERNESS BA, PHELPS WC, SCHLEGEL R

Molecular mechanism of transformation by the human papillomaviruses
Genetics 1990; 15: 199-206

IARC MONOGRAPH

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Human
papillomaviruses, volume 64.

International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1995.

IFTNER T, HOLZ B

HPV und Zervixkarzinom – Fragen und Antworten
Frauenarzt 2002; 43(4): 438-441

IKENBERG H

Nachweis von HPV-Infektionen mit dem Viroactiv- Test
Gynäkol Prax 2002(a); 26: 531-532

IKENBERG H

Der Stellenwert der Papillomaviren und ihrer Diagnostik bei der Vorsorge
Ther Umsch 2002(b); 59: 489-494

IKENBERG H

HPV und intraepitheliale Neoplasien des unteren Genitales
Gynäkologe 2001(a); 34: 599-602

IKENBERG H

Controversials Früherkennung des Zervixkarzinoms
Neue Ansätze zur Diagnostik: pro HPV
Frauenarzt 2001(b);42: 757-759

JABLONSKA S, DABROWSKI J, JAKUBOWICZ K

Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses
in oncogenesis

Cancer Res 1972; 32: 583-589

JASTREBOFF AM, CYMET T

Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial
neoplasia and malignancy

Postgrad Med J 2002; 78: 225-228

JOSEFSSON AM, MAGNUSSON PK, YLITALO N, SORENSEN P, QWARFORTH-TUBBIN P, ANDERSEN PK, MELBYE M, ADAMI HO, GYLLENSTEN UB
Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study
Lancet 2000; 355: 2189-2193

KAHN JA, ROSENTHAL SL, SUCCOP PA, HO GY, BURK RD
Mediators of the association between age of first sexual intercourse and subsequent human papillomavirus infection
Pediatrics 2002; 109: E5

KARLSSON R, JONSSON M, EDLUND K, EVANDER M, GUSTAVSSON A, BODEN E, RYLANDER E, WADEL IG
Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: a population-based study
Sex Transm Dis 1995; 22: 119-127

KLAES R, WOERNER SM, RIDDER R, WENTZENSEN N, DÜRST M, SCHNEIDER A, LOTZ B, MELSHEIMER P, von KNEBEL DOEBERITZ M
Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes
Cancer Res 1999; 59: 6132-6136

KLUG SJ, BLETTNER M
Zervixkarzinom, HPV-Infektion und Screening: Stand der Dinge und Zukunftsperspektiven
Dtsch Arztebl 2003; 100: 132-136 [Heft 3]

KONNO R, SATO S, YAJIMA A
Progression of squamous cell carcinoma of the uterine cervix from cervical intraepithelial neoplasia infected with human papillomavirus: a retrospective follow-up study by in situ hybridization and polymerase chain reaction
Int J Gynecol Pathol 1992; 11: 105-112

KOSS LG, DURFEE GR
Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of coilocytic atypia.
Ann N Y Acad Sci 1956; 63: 1245-1261

KOUTSKY LA, HOLMES KK, CRITCHLOW CW, STEVENS CE, PAAVONEN J, BECKMANN AM, de ROUEN TA, GALLOWAY DA, VERNON D, KIVIAT NB
A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection
N Engl J Med 1992; 327: 1272-1278

KREIENBERG R
Früherkennung von Karzinomen der Zervix, Vulva, Vagina
Onkologie 2001; 7: 893-896

KÜPPERS V, SCHNÜRCH HG
Aktueller Stand der Krebsfrüherkennung des weiblichen Genitales
Gynäkologie 1997; 30: 624-630

MANOS MM, KINNEY WK, HURLEY LB, SHERMAN ME, SHIEH-NGAI J, KURMAN RJ, RANSLEY JE, FETTERMAN BJ, HARTINGER JS, McINTOSH KM, PAWLICK GF, HIATT RA

Identifying women with cervical neoplasia: Using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results

JAMA 1999; 281: 1605-1610

MELSHEIMER P, KAUL S, DOBECK S, BASTERT G

Immunocytochemical Detection of HPV High-Risk Type L1 Capsid Proteins in LSIL and HSIL as Compared with Detection of HPV L1 DNA

Acta Cytol 2003; 47(2): 124-128

MORIN C, BAIRATI I, BOUCHARD C, FORTIER M, ROY M, MOORE L, MEISELS A
Managing Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance in Papanicolaou Smears

J Reprod Med 2001; 46: 799-805

MYERS G, BAKER C, MÜNGER K, SVERDRUP F, Mc BRIDE A, BERNHARD HU
Human Papillomaviruses 1997.

Los Alamos, New Mexico, Los Alamos National Laboratory 1997

NEUMANN H, KLEIJER G, SAPP M, DOBECK S, KAUL S

VIROACTIV® A NEW ASSAY FOR THE DETECTION OF VIRULENT HPF INFECTIONS

Unveröffentlichte Befunde

NOBBENHUIS MA, WALBOOMERS JM, HELMERHORST TJ, ROZENDAAL L, REMMINK AJ, RISSE EK, van der LINDEN HC, VOORHORST FJ, KENEMANS P, MEIJER CJ

Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening: a prospective study

Lancet 1999; 354: 20-25

ÖSTÖR AG

Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review

Int J Gynecol Pathol 1993; 12: 186-192

PAPANICOLAOU GN

Survey of the actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis

Ann Int Med 1949; 31: 661-674

PAYNE N, CHILCOTT J, Mc GOOGAN E

Liquid-based cytology in cervical screening: a rapid and systematic review

Health Technol Assess 2000; 4:1-73

PETRY KU, MENTON S, van LOENEN-FROSCH F, de CARVALHO GOMES H, HOLZ B, SCHOPP B, GARBRECHT-BUETTNER S, DAVIES P, BOEHMER G, van den AKKER E, IFTNER T

Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients

Br J Cancer 2003; 88: 1570-1577

PLAXE SC, SALTZSTEIN SL

Estimation of the duration of the preclinical phase of cervical adenocarcinoma suggests that there is a ample opportunity for screening
Gynecol oncol 1999; 75: 55-61

PORRECO R, PENN I, DROEGEMUELLER W, GREER B, MAKOWSKI E

Gynecologic malignancies in immunosuppressed organ homograft recipients
Obstet Gynecol 1975; 45: 359-364

PORTER R

The greatest benefit to man kind: a medical history of humanity
New York: W W Norton, 1997

RATNAM S, FRANCO EL, FERENCZY A

Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000; 9: 945-951

RICHART RM

Natural history of cervical intraepithelial neoplasia
Clin Obstet Gynecol 1967; 10: 748-784

RICHART RM, MASOOD S, SYRJÄNEN KJ, VASSILAKOS P, KAUFMAN RH, MEISELS A, OLSZEWSKI WT, SAKAMOTO A, STOLER MH, VOOIJS GP, WILBUR DC

Human papillomavirus. International Academy of Cytology Task Force summary. Diagnostic Cytology Towards the 21st Century: An International Expert Conference and Tutorial
Acta Cytol 1998; 42: 50-58

ROTELI-MARTIN CM, DERCHAIN SF, MARTINEZ EZ, SIQUEIRA SA, ALVES VA, SYRJANEN KJ

Morphological diagnosis of HPV lesions and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is highly reproducible
Clin Exp Obstet Gynecol 2001; 28(2): 78-80

ROTELI-MARTIN CM, PANETTA K, ALVES VA, SIQUEIRA SA, SYRJANEN KJ, DERCHAIN SF

Cigarette smoking and high-risk HPV DN as predisposing factors for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young Brazilian women
Acta Obstet Gynecol Scand 1998; 77(6): 678-682

ROUS P, BEARD JW

The progression to carcinoma of virusinduced rabbit papillomas
J Exp Med 1935; 62: 523-548

SACHS L

Angewandte Statistik: Statistische Methoden und ihre Anwendung.
Springer, Berlin 1978; 118-119/ 258-259

- SAPP M, KRAUS U, VOLPERS C, SNIJDERS PJF, WALBOOMERS JM, STREECK RE
 Analysis of type-restricted and cross-restricted epitopes on virus- like particles of human papillomavirus type 33 and in infected tissues using monoclonal antibodies to the major capsid protein
 J Gen Virol 1994; 75: 3375-3383
- SCHEFFNER M, ROMANCZUK H, MUNGER K, HUIBREGTSE JM, MIETZ JA, HOWLEY PM
 Functions of human papillomavirus proteins
 Curr Top Microbiol Immunol 1994; 186: 83-99
- SCHIFFMAN M, HERRERO R, HILDESHEIM A, SHERMAN ME, BRATTI M, WACHOLDER S, ALFARO MHM, MORALES J, GREENBERG MD, LORINCZ A
 HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high- risk province in Costa Rica
 JAMA 2000; 283: 87-93
- SCHLECHT NF, KULAGA S, ROBITAILLE J, FERREIRA S, SANTOS M, MIYAMURA RA, DUARTE-FRANCO E, ROHAN TE, FERENCZY A, VILLA LL, FRANCO EL
 Persistent Human Papillomavirus Infection as a Predictor of Cervical Intraepithelial Neoplasia
 JAMA. 2001; 286: 3106-3114
- SCHNEIDER A, DÜRST M, KAUFMANN AM
 HPV- Infektion und Zervixkarzinom – Epidemiologie, Nachweis und Immunologie
 Zentralbl Gynakol 2001; 123: 179-185
- SCHNEIDER A, DÜRST M, KLUG SJ, KAUFMANN A; JOCHMUS I, GISSMANN L
 Epidemiologie, Ätiologie und Prävention des Zervixkarzinoms
 Onkologe 2001; 7: 814-826
- SCHNEIDER A, GISSMANN L
 Prävention des Zervixkarzinoms: Screening und Impfen
 Onkologe 2002; 8: 1053-1063
- SCHNEIDER A, HOYER H, DÜRST M
 Bedeutung des Nachweises von humanen Papillomaviren für die Vorsorge
 Dtsch Arztebl 2001; 98: A2517-A2521 (Heft 39)
- SCHNEIDER A, HOYER H, LOTZ B, LEISTRITZ S, KÜHNE- HEID R, NINDL I, MÜLLER B, HAERTING J, DÜRST M
 Screening for high grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for high risk HPV, routine cytology or colposcopy
 Int J Cancer 2000; 89: 529-534
- SCHNEIDER A, SCHEUNGRABER C, HOYER H, DÜRST M
 Früherkennung des Zervixkarzinoms: Zytologie oder HPV- Test?
 Gynäkologe 2002; 35: 181-192

SCHNEIDER A, SCHEUNGRABER C, IKENBERG H
Zervixkarzinom und HPV. Bedeutung der HPV- Testung für die Praxis
Frauenarzt 2002; 43(10): 1165-1170

SCHNEIDER V
Zervixabstriche noch Zeitgemäß?
Frauenheilkunde plus 2001; 4: 30

SCHWARTZ SM, WEISS NS
Increased incidence of adenocarcinoma of the cervix in young women in the United States
Am J Epidemiol 1986; 124: 1045-1047

SHOPE RE
Infectious papillomatosis of rabbits, with a note on the histopathology
J Exp Med 1933; 58: 607-624

SOLOMON D, SCHIFFMAN M, TARONE R
Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: Baseline results from a randomized trial
J Natl Cancer Inst 2001; 93: 293-299

STREECK RE, HILFRICH R
Papillomavirus- Infektionen. Latente, subklinische oder virulente Erkrankung? Neues Nachweisverfahren erlaubt eine Unterscheidung
Mta Spektrum 2000;4(S):233-236

THE BETHESDA SYSTEM FOR REPORTING CERVICAL/ VAGINAL CYTOLOGIC DIAGNOSIS
Acta Cytol 1993; 37: 115-124

TYRING SK
Human papillomavirus infections: Epidemiology, pathogenesis, and host immune response
J Am Acad Dermatol 2000; 43(1): S18-26

van der GRAAF Y, MOLIJN A, DOORNEWAARD H, QUINT W, van DOORN LJ, van den TWEEL J
Human Papillomavirus and the Long-term Risk of Cervical Neoplasia
Am J Epidemiol 2002; 156(2): 158-164

von KNEBEL DOEBERITZ M
Aspekte der Molekularen Pathogenese des Zervixkarzinoms für neue Marker in der Krebsfrüherkennung und Diagnostik
Zentralbl Gynakol 2001; 123: 186-191

von KNEBEL DOEBERITZ M
Papillomaviruses in human disease: Part I. Pathogenesis and epidemiology of human papillomavirus infection.
Eur J Med 1992 (a); 1: 415-423

von KNEBEL DOEBERITZ M

Papillomaviruses in human disease: Part II. Molecular biology and immunology of papillomavirus infections and carcinogenesis
Eur J Med 1992 (b); 1: 485-491

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): 12-19

WIELAND U, PFISTER H

Molecular Diagnosis of Persistent Human Papilloma Virus Infections
Intervirolgy 1996; 39: 145-157

WITT A, HUDELIST G, GREGOR H, KUCERA E, WALCHETSEDER C, CZERWENKA K

The detection of HPV DNA improves the recognition of cervical intraepithelial lesions
Arch Gynecol Obstet 2003; 268: 29-34

WOODMAN CB, COLLINS S, WINTER H, BAILEY A, ELLIS J, PRIOR P, YATES M, ROLLASON TP, YOUNG LS

Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women; a longitudinal cohort study
Lancet 2001; 357: 1831-1836

WRIGHT TCJ, LÖRINCZ A, FERRIS DG, RICHART RM; FERENCZY A, MIELZYNKA I, BORGOTTA L

Reflex human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in women with abnormal Papanicolaou smears
Am J Obstet Gynecol 1998; 178: 962-966

zur HAUSEN H

Papillomavirus infections – a major cause of human cancers
Biochim Biophys Acta 1996; 1288: F55-78

Zur HAUSEN H, de VILLIERS EM

Human papillomaviruses
Annu Rev Microbiol 1994; 48: 427-447

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Müller-Thurmann
Vorname	Svenja
Geburtsdatum	12.09.1972
Geburtsort	Düsseldorf
Familienstand	ledig

Schulbildung

1979-1983	Wilhelm-Busch-Grundschule, Ratingen
1983-1986	Kopernikus-Gymnasium, Ratingen
1986-1989	Deutsche Schule Paris, Paris
1989-1992	Humboldt Gymnasium, Düsseldorf

Studium

1993-2000	Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
2000-2001	Praktisches Jahr, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Ev. Krankenhaus Düsseldorf Wahlfach: Hals-,Nasen-,Ohrenheilkunde

Berufliche Tätigkeit

07/2001-06/2002	Ärztin im Praktikum in der Hals-, Nasen-, Ohrengemeinschaftsarztpraxis Drs. Müller- Thurmann/ Hiddemann
07/2002-12/2002	Ärztin im Praktikum in der Hals-,Nasen-, Ohrenklinik der Universität Essen
01/2003	Approbation als Ärztin

Düsseldorf, den 30.10.2003

**Immunhistochemischer Nachweis einer virulenten HPV-Infektion im Exfoliativabstrich versus HPV-Nachweis mittels Hybrid Capture Assay.
Eine vergleichende klinische Untersuchung**

Vorgelegt von Svenja Müller-Thurmann

In vielen Studien wurde gezeigt, daß es einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von humanen Papilomaviren (HPV) und dem biologischen Verhalten zervikaler Krebsvorstufen gibt. Es ist die Aufgabe von Vorsorgeuntersuchungen Präneoplasien zu erkennen und rechtzeitig zu therapieren. Zusätzlich zur jährlichen Abstrichuntersuchung wird eine Infektionstestung für HPV diskutiert, für die der Hybrid Capture Assay (HCA) als bisher einziges HPV Nachweisverfahren die Zulassung von der amerikanischen Gesundheitsbehörde bekommen hat.

Gegenstand dieser retrospektiven Studie war die Analyse des Zusammenhangs zwischen HPV- Status, durch zwei unterschiedliche Testverfahren ermittelt, und der morphologischen Zellbeurteilung. Von 115 Frauen wurden die Ergebnisse des HCA, des Viroactiv® Tests und die zytologischen Abstrichpräparate, nach Papanicolaou gefärbt, miteinander verglichen. Wir stellten fest, daß ein direkter Vergleich der zwei unterschiedlichen HPV Nachweisverfahren nicht möglich ist. Der Viroactiv® Test richtet sich gegen die L1 Hüllproteine humaner Papillomaviren, die nur bei aktiven Infektionen exprimiert werden. Diese Hüllproteine lassen sich, wie unsere Untersuchungsergebnisse gezeigt haben, bei höhergradigen zervikalen Zellveränderungen signifikant weniger häufig nachweisen, als bei geringgradigen Zellläsionen. Mit dem HCA wird Desoxyribonukleinsäure (DNA) des HPV nachgewiesen, ohne zu differenzieren, ob eine episomale Infektion vorliegt oder ob eine HPV- DNA- Integration im Wirtsgenom stattgefunden hat. Welche Relevanz ein positiver Viroactiv® Test für den klinischen Alltag hat sollte in großangelegten Follow- up- Studien untersucht werden. Die vorliegenden Daten lassen allerdings nicht erkennen, daß der Viroactiv® Test als Progressionsmarker eingesetzt werden kann.



PD Dr. med. V. Küppers