

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito
- Funktionsbereich Cytopathologie -

**Leistungsfähigkeit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung in
der Abklärung auffälliger gynäkologischer Abstrichbefunde**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Birgül Banu Dönmez-Kuloglu

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Monika Hampf

I. Zusammenfassung

Die regelmäßige gynäkologische Krebsvorsorge mittels PAP-Test hat zu einer beträchtlichen Reduktion der Inzidenz und Mortalität des Zervixkarzinoms beigetragen. Allerdings hat die PAP-Zytologie als singulärer Abstrich eine begrenzte Sensitivität, um zervikale Präkanzerosen zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist der HPV-Test ein hochsensitiver Test. Jedoch kann dieser nicht zwischen klinisch relevanten „transformierenden“ und vorübergehenden „transienten“ Infektionen unterscheiden, weswegen ein zusätzlicher Marker für ein effizientes *Screening* sinnvoll ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Leistungsfähigkeit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec[®] PLUS) mit den Ergebnissen der Zytologie sowie der Histologie (Probeexzision und/oder Konisation) zu vergleichen. Insgesamt wurden 350 Fälle die zwischen Dezember 2008 und August 2012 aus einer Dysplasie-Sprechstunde der Frauen-klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf stammten, in die Studie einbezogen. Die Präparate entsprachen dabei konventioneller Zytologie und enthielten mindestens eine leichte Dysplasie (Gruppe IIID (MN2), IIID1 (MN3) bzw. LSIL).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Sensitivität der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung am eigenen Material bezogen auf das zytologische Untersuchungsergebnis bei 68,5% lag, die Spezifität bei 65,5%, der positive Prädiktionswert bei 91,4% und der negative Prädiktionswert bei 27,9% lagen. Ähnliche Kombinationen von Werten ergaben sich auch im Vergleich für die histologischen Biopsie-Diagnostiken (68,7%; 60,6%; 88,2%; 31,0%) bzgl. aller 350 Fälle sowie bzgl. einem Teilkollektiv von 184 histologischen Konisation-Diagnostiken (71,7%; 38,9%; 91,5%; 13,0%). Für die der Studie vorliegenden Fälle kann man schlussfolgern, dass sich die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec[®] PLUS) zur Identifizierung von CIN II+ nicht als Suchtest eignet, da die Ergebnisse für die Sensitivität wie auch für die Spezifität zu gering ausfielen, wohingegen sowohl der hohe positive Prädiktions- als auch der niedrige negative Prädiktionswert der Doppelfärbung auf eine klinisch gut nutzbare Anwendung als Bestätigungstest oder Reflextest hindeutet.

II. Abstract

Regular gynaecological cancer screening using the PAP test has contributed to a considerable reduction in the incidence and mortality of cervical cancer. However, as a singular smear, the PAP cytology has a limited sensitivity to detect cervical precancerous lesions. In contrast, the HPV test is a highly sensitive test. On the other hand, it cannot distinguish between clinically relevant „transforming“ and temporary „transient“ infections, which is why an additional marker is useful for efficient screening.

The aim of this work is to compare the performance of the p16/Ki-67 double staining (CINtec[®] PLUS) with the results of the cytology and the histology (biopsy and/or conization). A total of 350 cases from a dysplasia consultation at the gynaecological clinic of the University Hospital Düsseldorf between December 2008 and August 2012 were included in the study. The preparations corresponded to the conventional cytology and contained at least one mild dysplasia (group IIID (MN2), IIID1 (MN3) or LSIL).

The results of this work show that the sensitivity of the p16/Ki-67 double staining on our own material based on the cytological examination result was 68,5%, the specificity led to 65,6%, the positive prediction value resulted in 91,4% and the negative prediction value was 27,9%. Similar combinations of values were also found in the comparison for the histological biopsy diagnostics (68,7%; 60,6%; 88,2%; 31,0%) for all 350 cases and for a sub-collective of 184 histological conization diagnostics (71,7%; 38,9%; 91,5%; 13,0%). For the cases presented in the study, it can be concluded that the p16/Ki-67 double staining (CINtec[®] PLUS) is not suitable as a search test for identifying CIN II+, as the results for sensitivity and specificity were too low, whereas both the high positive predictive value and the low negative predictive value of the double staining indicate a clinically useful application as a confirmatory or reflex test.

III. Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	I
II. Abstract	II
III. Inhaltsverzeichnis	III
IV. Tabellenverzeichnis	VIII
V. Abbildungsverzeichnis	XVII
VI. Abkürzungsverzeichnis	XIX
1. Einleitung	1
1.1. Historie der Prävention des Zervixkarzinoms	1
1.2. Humane Papillomaviren (HPV)	4
1.2.1. Verlauf und Übertragung der HPV-Infektion	4
1.2.2. Genom-Struktur	6
1.2.3. Ablauf der HR-HPV-Infektion	8
1.2.4. Zervikale Intraepitheliale Neoplasie	10
1.3. Diagnostische Verfahren in der Früherkennung des Zervixkarzinoms	14
1.3.1. Konventionelle Abstrichzytologie	15
1.3.2. Flüssigkeitsbasierte Zytologie (FBZ)	16
1.3.3. Kolposkopie	17
1.3.4. HPV-DNA-Nachweisverfahren	18
1.3.5. L1 Kapsidprotein-Nachweisverfahren	20
1.3.6. DNA-Bildzytometrie	21
1.3.7. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungsverfahren (FISH)	22

1.3.8. Histologie	23
1.4. p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung (CINtec [®] PLUS)	25
1.4.1. p16 ^{INK4a}	26
1.4.2. Ki-67	26
1.5. Ziel der Studie	27
2. Material und Methoden	28
2.1. Patientenkollektiv	28
2.1.1. Altersverteilung des Patientenkollektivs	29
2.2. Durchführung der immunzytochemischen Untersuchung	30
2.2.1. Entfernung der Deckgläser	31
2.2.2. Vorbereitung der Reagenzien	31
2.2.3. Rehydrierung	32
2.2.4. Epitopdemaskierung unter Verwendung des Wasserbades	32
2.2.5. Färbeprotokoll	33
2.2.6. Gegenfärbung mit Hämatoxylin	34
2.2.7. Eindecken im Zwei-Schritt-Verfahren	34
2.2.8. Deckglas	34
2.3. Auswertung	35
2.4. Datenerfassung und statistische Analyse	35
3. Ergebnisse	38
3.1. Graduelle Einteilung der Befunde	38
3.2. p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung vs. Zytologie	39

3.3. p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung vs. Probeexzision	41
3.4. p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung vs. Konisation	43
3.5. Zusammenfassung der p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbungsergebnisse	45
3.6. Korrelation der Befundung der zytologischen Abstriche, der Biopsien und der Konisationen	46
3.6.1. Zytologie vs. Probeexzision	46
3.6.1.1. Zytologie vs. Probeexzision nach der Münchner Nomenklatur II	47
3.6.1.2. Zytologie vs. Probeexzision nach dem Bethesda-System	49
3.6.1.3. Zytologie vs. Probeexzision nach der graduellen Einteilung	51
3.6.1.3.1. Identifizierung einer CIN II+ Läsion	52
3.6.1.3.2. Identifizierung einer CIN III+ Läsion	53
3.6.2. Zytologie vs. Konisation	54
3.6.2.1. Zytologie vs. Konisation nach der Münchner Nomenklatur II	54
3.6.2.2. Zytologie vs. Konisation nach dem Bethesda-System	57
3.6.2.3. Zytologie vs. Konisation nach der graduellen Einteilung	59
3.6.2.3.1. Nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+	59
3.6.2.3.2. Nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+	60
3.6.3. Probeexzision vs. Konisation	61
3.6.3.1. Probeexzision vs. Konisation analog zur Münchner Nomenklatur II	62
3.6.3.2. Probeexzision vs. Konisation nach dem Bethesda-System	64
3.6.3.3. Konisation vs. Probeexzision nach der graduellen Einteilung	66
3.6.3.3.1. Nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+	67
3.6.3.3.2. Nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+	68
3.6.4. Zusammenfassung der Vergleiche zu Zytologie, Probeexzision und Konisation	68
3.7. Vergleich Zytologie und Histologie	69

3.7.1. Zytologie vs. Histologie - 350 Fälle	70
3.7.1.1. Zytologie vs. Histologie nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+	71
3.7.1.2. Zytologie vs. Histologie nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+	72
3.7.2. Zytologie vs. Histologie - 184 Fälle	72
3.7.2.1. Zytologie vs. Histologie zur Identifizierung von CIN II+	73
3.7.2.2. Zytologie vs. Histologie zur Identifizierung von CIN III+	74
3.7.3. Zytologie vs. Probeexzision - 184 Fälle	75
3.7.3.1. Zytologie vs. Probeexzision zur Identifizierung von CIN II+	76
3.7.3.2. Zytologie vs. Probeexzision zur Identifizierung von CIN III+	77
3.7.4. Zytologie vs. Konisation - 184 Fälle	78
3.7.4.1. Zytologie vs. Konisation zur Identifizierung von CIN II+	78
3.7.4.2. Zytologie vs. Konisation zur Identifizierung von CIN III+	79
3.7.5. Zusammenfassung der Vergleiche zwischen zytologischen und histologischen Ergebnissen	80
4. Diskussion	82
4.1. Stellenwert der konventionellen Zytologie zur Vorhersage histologischer Gewebsveränderungen	83
4.2. Stellenwert der p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung in der Abklärungsdiagnostik auffälliger zytologischer Befunde	86
4.2.1. Aktuelle Literaturübersicht	86
4.2.2. Eigene Ergebnisse	91
4.3. Weitere Anwendungen der p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung in der gynäkologischen Zytologie	96

4.3.1. Leistungsfähigkeit der p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung bei negativer gynäkologischer Zytologie und positivem HPV-Befund	96
4.3.2. Leistungsfähigkeit der p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung bei zytologischem ASCUS-Befund bzw. LSIL-Befund	99
4.4. Zukunft der p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung nach der Reform der gynäkologischen Krebsvorsorge zum 1. Januar 2020	102
VII. Literaturverzeichnis	XXII
VIII. Danksagung	XLI

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: _____ 13f

Gegenüberstellung der WHO/Bethesda/Münchener-Nomenklatur zur Beschreibung von histologischen und zytologischen Befunden

Tabelle 2: _____ 19

Werte der HPV-Testung und der Zytologie bei der Identifizierung von CIN II+

Tabelle 3: _____ 36

Vierfeldertafel

Tabelle 4: _____ 37

Interpretationswerte des Kappa-Koeffizienten

Tabelle 5: _____ 38

Gegenüberstellung der einzelnen Definition bei den zytologischen und histologischen Befunden

Tabelle 6: _____ 39

Rohdaten p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec[®] PLUS) gegenüber Zytologie

Tabelle 7:	40
Vierfeldertafel - CINtec [®] PLUS, Zytologie bzgl. CIN II+	
Tabelle 8:	40
Vierfeldertafel - CINtec [®] PLUS, Zytologie bzgl. CIN III+	
Tabelle 9:	41
Rohdaten p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung (CINtec [®] PLUS) gegenüber Probeexzision	
Tabelle 10:	42
Vierfeldertafel - CINtec [®] PLUS, Probeexzision bzgl. CIN II+	
Tabelle 11:	42
Vierfeldertafel - CINtec [®] PLUS, Probeexzision bzgl. CIN III+	
Tabelle 12:	43
Rohdaten p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung (CINtec [®] PLUS) gegenüber Konisation	
Tabelle 13:	44
Vierfeldertafel - CINtec [®] PLUS, Konisation bzgl. CIN II+	
Tabelle 14:	44
Vierfeldertafel - CINtec [®] PLUS, Konisation bzgl. CIN III+	

Tabelle 15:	45
Übersicht der Vergleichswerte CINtec® PLUS, Zytologie, Probeexzision und Konisation	
Tabelle 16:	46
Rohdaten Zytologie gegenüber Probeexzision ohne p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung (CINtec® PLUS)	
Tabelle 17a:	47
Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der Münchner Nomenklatur II	
Tabelle 17b:	48
Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der Münchner Nomenklatur II	
Tabelle 17c:	48
Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der Münchner Nomenklatur II	
Tabelle 17d:	49
Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der Münchner Nomenklatur II	
Tabelle 18a:	50
Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach dem Bethesda-System	
Tabelle 18b:	50
Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach dem Bethesda-System	

Tabelle 18c: _____	51
Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach dem Bethesda-System	
Tabelle 19: _____	52
Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+	
Tabelle 20: _____	53
Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+	
Tabelle 21: _____	54
Rohdaten Zytologie gegenüber Konisation ohne p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung (CINtec [®] PLUS)	
Tabelle 22a: _____	55
Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II	
Tabelle 22b: _____	55
Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II	
Tabelle 22c: _____	56
Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II	
Tabelle 22d: _____	56
Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II	

Tabelle 23a: _____	57
Kreuztafel Zytologie, Konisation nach dem Bethesda-System	
Tabelle 23b: _____	57
Kreuztafel Zytologie, Konisation nach dem Bethesda-System	
Tabelle 23c: _____	58
Kreuztafel Zytologie, Konisation nach dem Bethesda-System	
Tabelle 24: _____	59
Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+	
Tabelle 25: _____	60
Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+	
Tabelle 26: _____	61
Rohdaten Probeexzision gegenüber Konisation ohne p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung (CINtec [®] PLUS)	
Tabelle 27a: _____	62
Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II	
Tabelle 27b: _____	63
Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II	

Tabelle 27c: _____	63
Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II	
Tabelle 27d: _____	64
Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II	
Tabelle 28a: _____	65
Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach dem Bethesda-System	
Tabelle 28b: _____	66
Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach dem Bethesda-System	
Tabelle 28c: _____	66
Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach dem Bethesda-System	
Tabelle 29: _____	67
Kreuztafel Konisation, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+	
Tabelle 30: _____	68
Kreuztafel Konisation, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+	
Tabelle 31: _____	69
Übersicht der Vergleichswerte Zytologie, Probeexzision sowie Konisation untereinander	

Tabelle 32: _____	70
Rohdaten Zytologie gegenüber Histologie	
Tabelle 33: _____	71
Kreuztafel Zytologie, Histologie nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+	
Tabelle 34: _____	72
Kreuztafel Zytologie, Histologie nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+	
Tabelle 35: _____	73
Rohdaten Zytologie gegenüber Histologie (184 Fälle)	
Tabelle 36: _____	74
Kreuztafel Zytologie, Histologie nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+ (184 Fälle)	
Tabelle 37: _____	75
Kreuztafel Zytologie, Histologie nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+ (184 Fälle)	
Tabelle 38: _____	76
Rohdaten Zytologie gegenüber Probeexzision	
Tabelle 39: _____	76
Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+	

Tabelle 40: _____ 77

Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+

Tabelle 41: _____ 78

Rohdaten Zytologie gegenüber Konisation

Tabelle 42: _____ 79

Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+

Tabelle 43: _____ 80

Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+

Tabelle 44: _____ 81

Zusammenfassung der Zytologie vs. Histologieergebnisse bzgl. CIN II+/CIN III+

Tabelle 45: _____ 84

Auszug aus der Jahresstatistik der Gynäkologischen Vorsorgezytologie für das Jahr 2016

Tabelle 46: _____ 87f

Daten zur Treffsicherheit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung in der gynäkologischen Zytologie nach Reviews und Meta-Analysen

Tabelle 47: _____ 90

Daten zur Treffsicherheit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung in der gynäkologischen Zytologie für CIN II+ Läsionen bezogen auf Teilkollektive der PALMS-Studie

Tabelle 48: _____ 100

Daten zur mittleren Treffsicherheit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung in der gynäkologischen Zytologie mit Diagnosen von ASCUS bzw. LSIL für das Vorliegen einer CIN II+ Läsion oder einer CIN III+ Läsion

V. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: _____ 1

H. Hinselmann

Abb. 2: _____ 2

Eine ca. 120-fache Vergrößerung eines Vaginalabstrichs mit squamösen Zellen und einer Vielzahl von Leukozyten

Abb. 3: _____ 2

Eine ca. 120-fache Vergrößerung eines Vaginalabstrichs mit Zervixkarzinom, wobei die Leuko- und Monozyten als dunkle Gruppierungen erkennbar sind

Abb. 4: _____ 3

Eine ca. 300-fache Vergrößerung eines Vaginalabstrichs mit Zervixkarzinom, wobei die Monozytengruppen vergrößerte hyper-chromatische Zellkerne aufweisen

Abb. 5: _____ 6

HPV, welche die Zervix infizieren, gehören der Gruppe *alpha* an

Abb. 6: _____ 7

Genom-Code-Darstellung des HPV-16

Abb. 7: _____ 8

Visualisierung eines Infektionsverlaufes

Abb. 8: _____ 10

Simulation des Zellzyklusablaufs bei der HR-HPV induzierten Karzinogenese

Abb. 9: _____ 12

Dysplasie-Grade

Abb. 10: _____ 29

Patientinnen sortiert nach Alter; Abszisse: Patientenalter; Ordinate: Patientenzahl

Abb. 11: _____ 30

Präparate sortiert nach Patientenalter; Abszisse: Präparate; Ordinate: Patientenalter

VI. Abkürzungsverzeichnis

AGC	<i>Atypical glandular cells</i>
AP	<i>Alkaline-phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase)
ASC-H	<i>Atypical squamous cells exclude</i>
ASC-US	<i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i>
CIN (I, II, III)	<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i> (Zervikale Intraepitheliale Neoplasie)
CINtec® PLUS	p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung Immunzytologie
DAB	<i>3,3`-diaminobenzidine tetrahydrochloride</i> (3,3`-Diaminbenzidin-Chromogen)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
E6-AP	<i>E6-associated protein</i>
ER	<i>Early region</i>
FBZ	Flüssigkeitsbasierte Zytologie
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FISH	Floureszenz-in-situ-Hybridisierungsverfahren
G₀-Phase	Ruhephase
G₁-Phase	Postmitotische Wachstumsphase
G₂-Phase	Postsynthesephase
HC2	<i>Hybrid Capture 2 Test</i>
HPV	Humane Papillomaviren
HR-HPV	<i>High-risk HPV</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)

HSIL	<i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i>
hTERC	<i>Human telomerase RNA gene component</i>
κ	Kappa-Koeffizient
KBV	Kassenärztliche Bundesvereinigung
Ki-67	Proliferationsmarker
KJJ₂	Jod-Jodkalium-Lösung
Klon 274-11 AC3	Monoklonale Maus-Antikörper
Klon E6H4	Monoklonale Kaninchen-Antikörper
L1	Hauptkapsidprotein
L2	Nebenkapsidprotein
LBC	<i>Liquid based cytology</i>
LCR	<i>Long Control Region</i>
LEEP	<i>Loop Electric Excision Procedure</i>
LLETZ	<i>Large Loop Excision of the Transformation Zone</i>
LR	<i>Late region</i>
LR-HPV	<i>Low-risk HPV</i>
LSIL	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
M-Phase	Mitose
MDM	<i>Murine double minute</i>
NCR	Nichtkodierende Region
NILM	<i>Negative for intraepitheliale lesion or malignancy</i>
NPV	Negativer Prädiktionwert
ORFs	<i>Open reading frames</i> (Onkogene E1, E2, E4, E5, E6, E7)
P₀	Konkordanzrate

p14^{ARF}	Protein
p53	Tumorsuppressorprotein
PAP	Papanicolaou
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Probeexzision
PPV	Positiver Prädiktionswert
pRB	Rentinoblastomprotein
PubMed	<i>Public MEDLINE</i> (Literatur Datenbank)
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
S-Phase	Synthesephase
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i>
SEN	Sensitivität
SPEZ	Spezifität
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STIKO	Ständige Impfkommision
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)

1. Einleitung

Durch Früherkennungsmaßnahmen ist es insbesondere in den vergangenen 50 Jahren, nämlich seit der Einführung der gynäkologischen Krebsvorsorge im Jahr 1971, gelungen die Inzidenz und die Mortalität des Gebärmutterhalskrebses in Deutschland deutlich zu senken. Erste Ansätze hierzu reichen aber viel weiter zurück; zwei besonders wesentliche Aspekte sollen im Folgenden erörtert werden.

1.1. Historie der Prävention des Zervixkarzinoms

Zur Vermeidung einer vollständigen Hysterektomie - somit zur Gebärmutterbewahrung, und darüber hinaus zur Fertilitätserhaltung der Frau - mussten frühdiagnostische Verfahren entwickelt werden. Diese beiden Entwicklungen, die zur Verbesserung der Karzinomdiagnostik und Karzinomtherapie des weiblichen Genitalbereichs gehören, fallen in die 20er Jahre. Dem norddeutschen Gynäkologen Hinselmann ist die Einführung der Kolposkopie im Jahr 1924 zu verdanken. Diese erlaubt eine 3,5-20-fache Vergrößerung der Zervix und trägt somit zur verbesserten visuellen Gebärmutterhalsdiagnostik und damit zur Frühdiagnostik sichtbarer Läsionen bei, aus denen simultan auch Gewebeproben für die histologische Untersuchung gewonnen werden können.



Abb. 1: H. Hinselmann
(mit freundlicher Genehmigung vom Springer-Verlag)

Die mithilfe der Kolposkopie durchgeführte sog. Schiller'sche Jodprobe hat bis heute Relevanz und geht auf dessen Namensgeber, den österreichisch-amerikanischen Mediziner Schiller, zurück. Dieser fand, dass die Abgrenzung zwischen atypischen und normalen Epithel unter dem Mikroskop scharf und sichtbar war. Er bemerkte auch, dass die erstgenannten wenig bzw. kein Glykogen enthalten und daher mit einer 1%igen wässrigen Jod-Kali-Lösung nachgewiesen werden können und, dass sie sich nur schwach hellbraun bzw. ockerfarben darstellen oder gar ungefärbt bleiben, wohingegen sich die normalen Epithelien dunkel(braun) anfärben [Schiller 1928; Bubendorf et al. 2011, S. 99f].

Ein weiterer Durchbruch in der Frühdiagnostik ist die Einführung der gynäkologischen Abstrichzytologie, auch PAP-Test genannt. Der Mediziner Papanicolaou stellte in den USA auf der *Third Race Betterment Conference* im Jahre 1928 diesen Test vor und beschreibt in dessen Publikation *Proceedings of the Conference* seine Untersuchungen und Ergebnisse [Papanicolaou 1928]. Im Folgenden sind die wesentlichen Abstriche aus dieser Arbeit graphisch abgebildet und die Beobachtungen beschrieben:

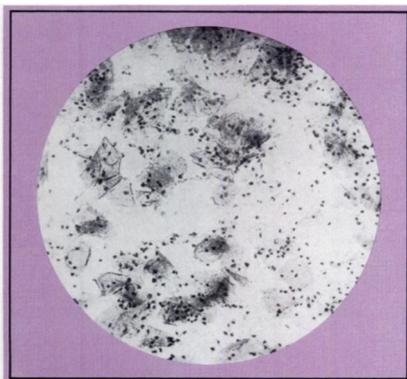


Abb. 2: Eine ca. 120-fache Vergrößerung eines Vaginalabstrichs mit squamösen Zellen und einer Vielzahl von Leukozyten

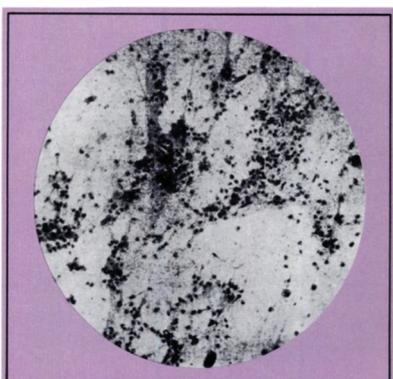


Abb. 3: Eine ca. 120-fache Vergrößerung eines Vaginalabstrichs mit Zervixkarzinom, wobei die Leuko- und Monozyten als dunkle Gruppierungen erkennbar sind

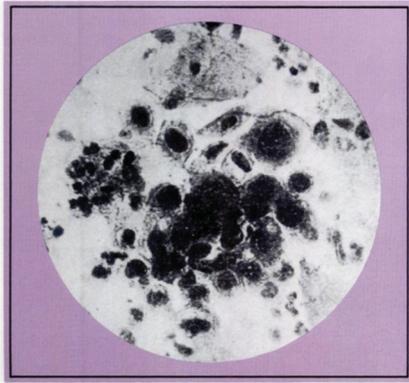


Abb. 4: Eine ca. 300-fache Vergrößerung eines Vaginalabstrichs mit Zervixkarzinom, wobei die Monozytengruppen vergrößerte hyper-chromatische Zellkerne aufweisen

(Abb. 2-4: mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons)

Jedoch fand dieser ursprüngliche Beitrag keine große Beachtung. Erst die im Jahre 1943 zusammen mit Traut veröffentlichte Arbeit *Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear* erbrachte die internationale Aufmerksamkeit [Papanicolaou und Traut 1943]. Die erste Krebsfrüherkennungsmethode war entwickelt und bleibt bis heute die standardmäßig durchgeführte *Screening*-Methode der Exfoliativzytologie. In der Bundesrepublik Deutschland ist seit 1971 der PAP-Test als Früherkennungsuntersuchung im Rahmen der gesetzlichen Krankenversicherungsleistung integriert. Ab dem 20. Lebensalter hatte jede Frau gemäß der bis zum 31.12.2019 geltenden Regelung einen jährlichen Anspruch auf eine gynäkologische Krebsvorsorgeuntersuchung. Diese Früherkennungsmaßnahme führte innerhalb von dreißig Jahren zu einem drastischen Rückgang von ca. 60%-70% der Inzidenz und Mortalität an Zervixkarzinomen [Becker et al. 2008, S. 287; BMG 2012, S. 20]. Auch in der seit dem 1. Januar 2020 geltenden Neuregelung der gynäkologischen Krebsvorsorge, die als zweites Standbein nunmehr die HPV-Testung mit berücksichtigt, kommt der Zytologie eine weiterhin sehr wesentliche Rolle zu, auch wenn sich die Untersuchungsintervalle bei Patientinnen ab 35 Jahren, solange die Zytologie unauffällig ist und der HPV-Test negativ ausfällt, auf drei Jahre verlängert haben.

Seit mehreren Jahrzehnten weiß man inzwischen, dass Zervixkarzinome Folge einer transformierenden Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) sind. Hierauf wird in Kapitel 1.2. näher eingegangen. Die Entdeckung des *high-risk* humanen Papillomavirus-Subtyps-16 (HR-HPV-16) im Jahre 1983 und weitere Beiträge brachten zur Hausen 2008 den Nobelpreis für Medizin. Von dieser Entdeckung ausgehend erfolgte die weitere Spezifizierung der HPV-Subtypen, unter anderem die Entdeckung weiterer *low-risk*- (z.B.

HPV-6 und -11) und *high-risk*-Typen (z.B. HPV-18). Nach heutigem Wissensstand ist bekannt, dass der Großteil der Frauen sich im Leben einmal oder mehrfach mit humanen Papillomaviren infiziert, die Infektion jedoch mehrheitlich sowohl klinisch inapparent bleibt, als auch nicht zum Gebärmutterhalskrebs führt.

Die fokussierte Forschung führte schließlich zu zwei verschiedenen Impfstoffen mit den Handelsnamen Gardasil® und Cervarix®, welche in Deutschland zugelassen sind. Beide Impfstoffe gewährleisten den Schutz gegen die bei Zervixkarzinom am häufigsten nachweisbaren Virustypen HR-HPV-16 und HR-HPV-18, wobei Gardasil® zusätzlichen Schutz gegenüber Virusinfektionen durch LR-HPV-6 und LR-HPV-11 bietet. Ein neuer Impfstoff, als Gardasil 9 bezeichnet, ist seit Mitte 2015 in Deutschland zugelassen und schützt gegen neun HPV-Typen (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58). Die Ständige Impfkommission (STIKO) empfiehlt seit 2018 Mädchen und Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren, um die Krankheitslast durch HPV-assoziierte Tumoren zu reduzieren, sich gegen HPV zu impfen [Eckart 2011, S. 136; Kreienberg et al. 2011, S. 379; Kaufmann et al. 2013, S. 368ff; RKI 2018].

1.2. Humane Papillomaviren (HPV)

1.2.1. Verlauf und Übertragung der HPV-Infektion

Es wird vermutet, dass das kumulative Risiko im Verlauf eines Frauenlebens, sich mit HPV zu infizieren, bei ca. 80% liegt. Frauen unter 30 Jahren sind am häufigsten betroffen. Etwa zehn Prozent aller Frauen infizieren sich mit einem oder mehreren Virusstämmen aus dem Bereich der *high-risk* HPV, von diesen erkrankt allerdings nur ca. 1%. Ungefähr 70% der Infektionen bilden sich spontan zurück [Nauth 2014, S. 174]. Nur wenn die HPV-Infektion persistiert und transformiert wird, kann eine zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) entstehen und sich gegebenenfalls später ein invasives Karzinom entwickeln [Hillemanns et al. 2007, S. 2; Breitenecker 2009, S. 131].

In einer Studie aus dem Jahr 1993 veröffentlichte Östör Zahlen zur Wahrscheinlichkeit der Regression, Persistenz und Progredienz von zervikalen intraepithelialen Neoplasien. Bei einer HPV assoziierten CIN I kann in 57% der Fälle eine spontane Regression eintreten und in 32% der Fälle persistieren. Nur in 11% der Fälle geht eine leichtgradige Veränderung der Zervix in ein *Carcinoma in situ* und in etwa 1% der Fälle in ein invasives Karzinom über. Bei einer CIN II bilden sich in 43% der Fälle die Veränderungen spontan zurück. In 35% der Fälle persistiert die Dysplasie, ein Progress zum *Carcinoma in situ* tritt in 22% der Fälle auf und in 5% der Fälle zum invasiven Karzinom. Bei einer CIN III kann in 32% der Fälle eine spontane Ausheilung eintreten. Zur Persistenz kann es in 56% der Fälle kommen. Eine schwergradige Läsion hat die höchste Wahrscheinlichkeit zur Progression und führt in ca. 12% der Fälle zur Entstehung eines invasiven Karzinoms [Östör 1993, S. 190]. Die durchschnittliche Progressionszeit bis zum *Carcinoma in situ* beträgt bei der CIN I (leichte Dysplasie) etwa 5-7 Jahre, bei der CIN II (mäßige Dysplasie) 3-4 Jahre und bei CIN III (schwere Dysplasie) etwa ein Jahr. Der Zeitraum von einer initialen Läsion bis zur Invasivität kann im Durchschnitt etwa 10-15 Jahre betragen [Kaufmann et al. 2013, S. 443f].

Die Übertragung der HPV-Infektion erfolgt in erster Linie durch ungeschützten Geschlechtsverkehr. Weitere wahrscheinlich assoziierte Faktoren für eine Infektion, die teilweise miteinander zusammenhängen dürften, werden folgendermaßen aufgelistet [Breitenecker 2009, S. 130; Petru et al. 2011, S. 73]:

- Alter der Frau bei Aufnahme eines regelmäßigen Geschlechtsverkehrs
- Zahl der Geschlechtspartner
- andere Geschlechtskrankheiten
- Anzahl der Geburten und Aborte
- sozioökonomischer Status
- Nikotinabusus
- mangelhafte Genitalhygiene

1.2.2. Genom-Struktur

Es sind derzeit mehr als 100 verschiedene humane Papillomavirus-Typen bekannt, die sowohl die Haut, als auch die Schleimhäute infizieren können (s. Abb. 5).

Anhand ihrer DNA-Eigenschaften kann man diese in fünf Genera aufteilen (*alpha*, *beta*, *gamma*, *mu* und *nu*), wobei die ersten beiden die größten Gruppen ausmachen und 90% der derzeit identifizierten HPV-Typen beinhalten. Dies veranschaulicht auch die untere Abbildung 5 nach Doorbar [Doorbar 2006, S. 526].

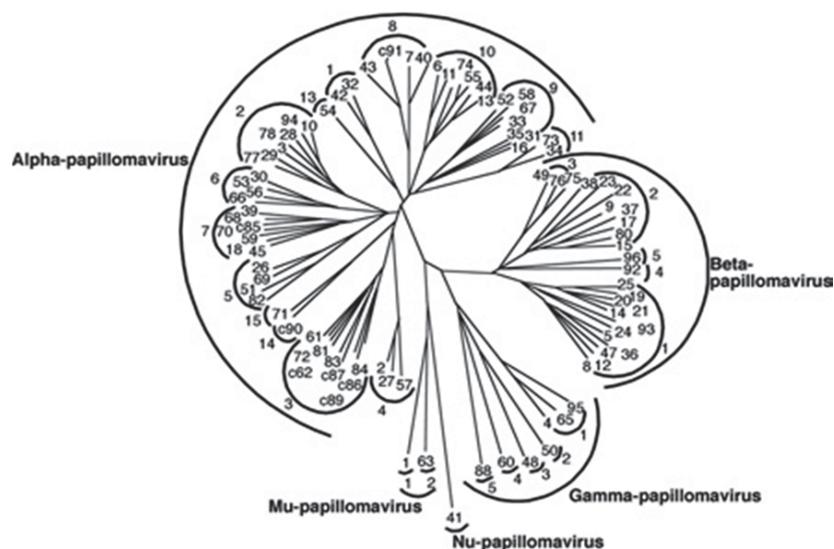


Abb. 5: HPV, welche die Zervix infizieren, gehören der Gruppe *alpha* an

(mit freundlicher Genehmigung vom Portland Press)

Etwa die Hälfte der derzeit identifizierten HPV-Typen gehören der Gruppe *alpha* an und infizieren hauptsächlich den Anogenitalbereich. Aufgrund ihres onkogenen Potenzials können viele dieser HPV-Typen einer von zwei unterschiedlichen Risikokategorien zugeteilt werden. Die Einteilung erfolgt in eine Hochrisikogruppe (*high-risk* HPV (HR-HPV)) und in eine Niedrigrisikogruppe (*low-risk* HPV (LR-HPV)). Zu den HR-HPV Subtypen gehören 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 sowie 56. Insbesondere Infektionen mit HPV-16 oder HPV-18 können zur Entwicklung von prämaligen Läsionen oder gar malignen

Läsionen, darunter auch des Zervixkarzinoms, führen. Im Gegensatz dazu wird den LR-HPV Subtypen 6, 11, 42, 43 sowie 44 kein entscheidendes onkogenes Potenzial zugeschrieben. Sie können gutartige Läsionen wie anogenitale Warzen (*Condylomata acuminata*) auslösen [Bubendorf et al. 2011, S. 122f]. Die übrigen vier Genera *beta*, *gamma*, *mu* und *nu* infizieren bevorzugt die Haut, wobei die letzten drei genannten nicht kanzerogen sind.

Aus Doorbar entnommen folgt eine sehr anschauliche Genom-Code-Darstellung des HPV-16 [Doorbar 2006, S. 528]:

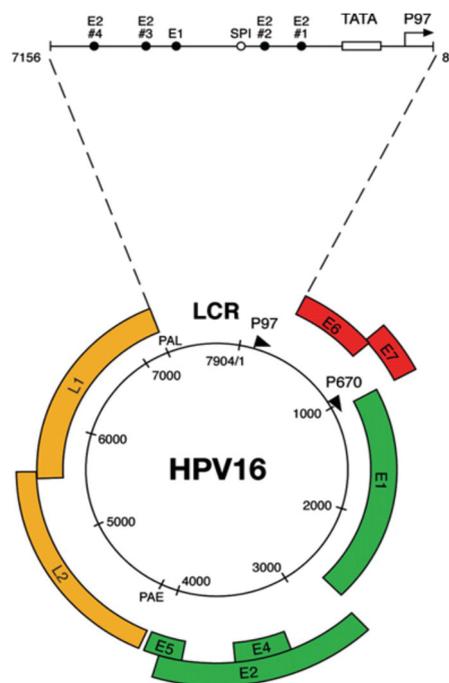


Abb. 6: Genom-Code-Darstellung des HPV-16 [Doorbar 2006]

(mit freundlicher Genehmigung vom Portland Press)

Die Papillomaviren bestehen aus relativ kleinen, etwa 50 nm großen und unbehüllten Viruskapsiden, in denen die zirkuläre doppelsträngige DNA mit einer Länge von etwa 8000 Basenpaaren vorliegt. Das virale Genom setzt sich aus acht *open reading frames* (ORF) zusammen, die alle von einem DNA-Strang abgelesen werden. Diese Gene werden, neben einem nicht-kodierten Abschnitt (LCR/URR/NCR), in zwei proteinkodierte Bereiche unterteilt, nämlich zum einen in die *early region* (ER) sowie zum anderen in die *late region*

(LR). Die erstgenannte enthält sechs ORFs, und zwar E1, E2, E4, E5 sowie die Onkogene E6 und E7, welche größtenteils für die virale Genexpression und Replikation verantwortlich sind. Die LR besitzt zwei ORFs, nämlich das Haupt- (L1) bzw. das Nebenkapsidprotein (L2), welche in der Endphase das virale Genom einhüllen, so dass es überlebens- und infektiösfähig bleiben kann [Trunk et al. 2005, S. 283f].

1.2.3. Ablauf der HR-HPV-Infektion

Die charakteristische anatomische Prädilektionsstelle des HPV-assoziierten Zervixkarzinoms liegt in der Regel im Bereich des Übergangs von Ekto- zu Endozervix, der sog. Transformationszone, in denen ein einschichtiges glanduläres Epithel auf ein mehrschichtiges nicht-verhorntes Plattenepithel trifft [Reuschenbach et al. 2011, S. 452]. Besonders anfällig für Infektionen sind die Basalzellen des Plattenepithels. Den Infektionsverlauf visualisiert die folgende Abb. 7 nach Doorbar [Doorbar 2006, S. 528]:

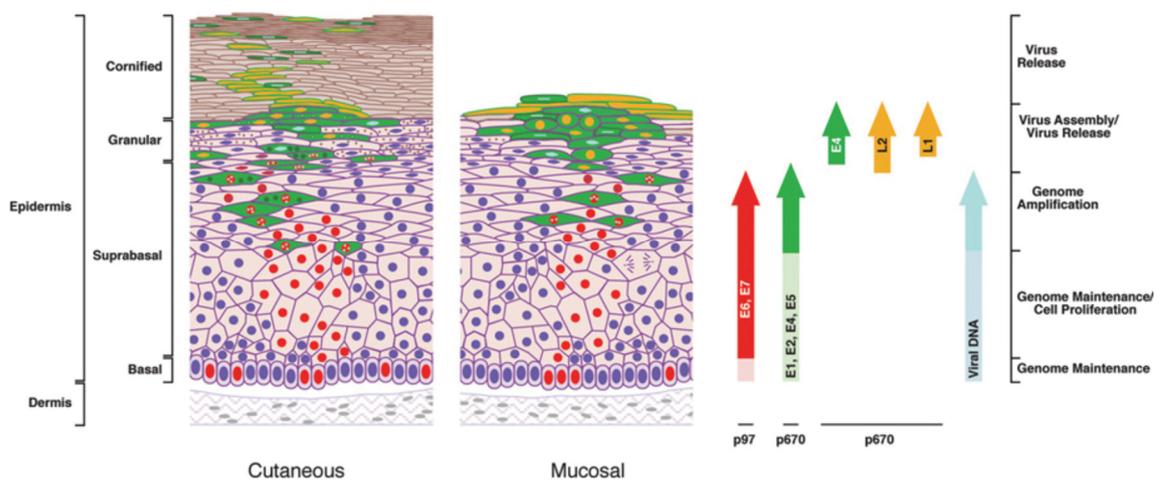


Abb. 7: Visualisierung eines Infektionsverlaufes [Doorbar 2006]

(mit freundlicher Genehmigung von Portland Press)

Durch Mikroläsionen begünstigt, können sich die Humanen Papillomaviren an die Basalmembran binden und somit die Basalzellen des Plattenepithels infizieren. Die durch HPV hervorgerufenen Läsionen weisen stets ein monoklonales Wachstumsmuster auf, so dass später von mehreren infizierten Basalzellen nur eine Läsion wächst [Münger 2002]. Es

wird vermutet, dass für diese Infektion bzw. Bindung primär Rezeptoren wie Heparansulfatproteoglykane [Pettersson et al. 2005] und sekundär das $\alpha 6$ -Integrin [Evander et al. 1997] essentiell sind. Bei HPV-16 erfolgt die Endozytose in die Wirtszellen durch eine *Clathrin*-Schicht und z.B. bei HPV-31 durch Clathrin-unabhängige *Caveolae* [Day et al. 2003, S.1; Doorbar 2006, S. 527]. Das virale Kapsid löst sich mittels Endosomen auf und wird durch Lysosomen abgebaut. Begünstigt durch das Nebenkapsidprotein L2 gelangt die virale DNA erst in das Zytoplasma und anschließend in den Zellkern [Richards et al. 2005, S. 1552]. Das virale Genom vervielfacht sich als Episom, d.h. als extra-chromosomales und autonom replizierendes DNA-Molekül, in der Basalzellschicht in eher geringer Kopienzahl (etwa 20- bis 100-fach pro Basalzelle) und bedarf dazu der Funktion des viralen Replikationsproteins E2, welches E1 im nicht-kodierten Bereich rekrutiert. Diese beiden Proteine dienen auch zur Teilung und zum Erhalt des Episoms in der Wirtszelle. Die jeweiligen Entwicklungsstufen werden in Abschnitt 1.2.4. genauer erläutert.

Erst die Differenzierung der infizierten Basalzellen in die Suprabasalschicht ermöglicht die Expression der viralen Gene. Dabei regulieren die *early-region*-ORFs E1 und E2 die Aktivierung der übrigen ER-ORFs und somit unter anderem der Onkogene E6 und E7 [Conway et al. 2009, S. 307]. Die Expression von E6 und E7 spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Dysplasien, welche, wie bereits oben erwähnt, sich nur in ca. 1% der Fälle zu einem Karzinom entwickeln.

Das E6-Gen bindet das Tumor-Suppressorprotein p53, welches wiederum das zelluläre Protein E6-AP (*E6-associated protein*) bindet, so dass insgesamt ein trimerer Komplex entsteht. Dies verhindert die Apoptosefähigkeit der Zellen durch Inaktivierung des p53. Zudem führt das Onkogen E6 zur Telomerase-Aktivität, welches zum Erhalt der Zellteilungsfähigkeit dient [Trunk et al. 2005, S. 286].

Von nicht minderer Bedeutung ist das Onkogen E7. Dieses Onkoprotein interagiert mit der hypophosphorylierten Form des Retinoblastom-Proteins (pRB), welches mit dem Transkriptionsfaktor E2F ein Retinoblastom-E2F-Transkriptionsfaktor-Komplex aus-

macht. Diese Wechselbeziehung löst den Komplex und E7 bindet sich mit pRB, wohingegen E2F die für die virale DNA Replikation erforderlichen Zellproteine, wie Cyclin A und Cyclin E, aktiviert. Dies wiederum bedingt eine unkontrollierte und erhöhte Zellproliferation, welche ein Karzinomwachstum fördert. Durch diesen Prozess kommt es zusätzlich zu einer massiven Überexpression des p16^{INK4a}-Proteins. Ferner löst E2F das Protein p14^{ARF} aus, dessen Expression in direktem Zusammenhang mit p16 steht, und hemmt das MDM (*murine double minute*). Infolge dessen wird auch der p53 Anteil blockiert [Hillemanns et al. 2007, S. 3f; Trunk et al. 2005, S. 286f; Doorbar 2006, S. 530].

Die Funktion der Onkogene E6 und E7 werden in der folgenden Abb. 8 nach Trunk et al. veranschaulicht [Trunk et al. 2005, S. 287]:

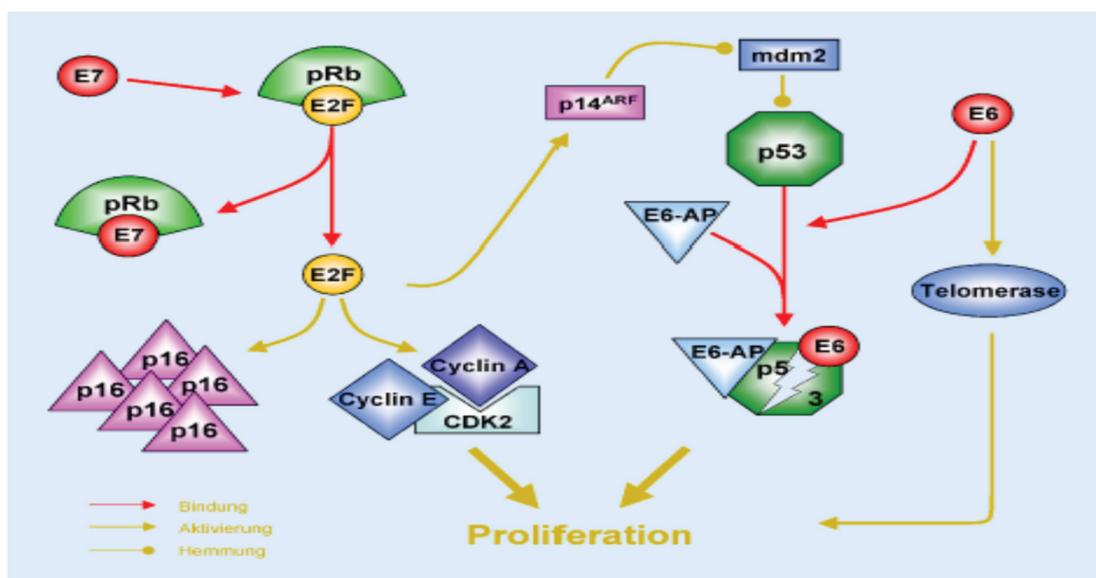


Abb. 8: Simulation des Zellzyklusablaufs bei der HR-HPV induzierten Karzinogenese [Trunk et a. 2005]

(mit freundlicher Genehmigung vom Springer-Verlag)

1.2.4. Zervikale Intraepitheliale Neoplasie

Die zervikale intraepitheliale Neoplasie, engl. *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN), ist eine Bezeichnung für abnorme Zellveränderungen in der Schleimhaut des Gebärmutterhalses, die durch histologische Untersuchungen festgestellt worden sind. Seitens der

Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden, um den Grad der Dysplasie wiederzugeben, die Einteilungen eins bis drei verwendet [Hillemanns et al. 1997; Nauth 2014 S. 181f]. In der europäischen Nomenklatur werden die einzelnen CIN-Grade leichten, mittleren bzw. schweren Dysplasien sowie dem *Carcinoma in situ* zugeordnet. Die in den USA im Jahre 1988 [NCI 1989 S. 567ff] eingeführte und 2001 modifizierte Bethesda-Nomenklatur ordnet die drei Formen der CIN in ein zweigliedriges System der plattenepithelialen nicht-invasiven Läsionen (*squamous intraepithelial lesions*) ein. Unterschieden werden:

- **CIN I** (leichte Dysplasie): Die abnormen Zellen differenzieren sich von der Basalzellschicht in die Suprabasalschicht, die Ausdehnung bleibt jedoch auf das untere Drittel des Plattenepithel begrenzt (**LSIL** = *low-grade squamous intraepithelial lesion*)

(Remission ca. 57%, Persistenz ca. 32%, Progression ca. 11%)

- **CIN II** (mäßige Dysplasie): Die Trennung zwischen CIN II und CIN III ist fließend, in der Regel sind etwa zwei Drittel des Plattenepithels eingenommen (**HSIL** = *high-grade squamous intraepithelial lesion*)

(Remission ca. 43%, Persistenz ca. 35%, Progression ca. 22%)

- **CIN III** (schwere Dysplasie und *Carcinoma in situ*): Nahezu das gesamte Plattenepithel ist in allen Schichten betroffen (**HSIL** = *high-grade squamous intraepithelial lesion*)

(Remission ca. 32%, Persistenz ca. 56%, Progression ca. 12%)

Die Angaben zur Remission, Persistenz sowie zur Progression stammen aus Östör [Östör 1993, S. 190].

Die untere Abb. 9 stellt die unterschiedlichen Grade der Dysplasie dar [Doorbar 2006, S. 533]:

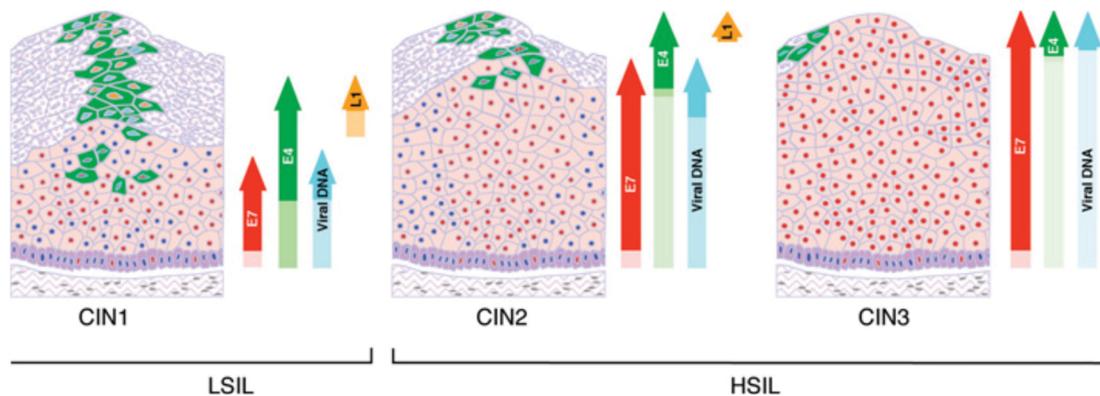


Abb. 9: Dysplasie-Grade [Doorbar 2006] (mit freundlicher Genehmigung von Portland Press)

Die Veränderungen der einzelnen CIN-Formen findet auch ein Äquivalent in der zytologischen Nomenklatur, womit in Deutschland die gynäkologischen Abstriche beurteilt werden. Sowohl in der bis zum 30. Juni 2014 gültigen modifizierten Münchner Nomenklatur II [Nauth 2014, S. 366], als auch in der seitdem eingeführten Münchner Nomenklatur III [Griesser et al. 2013, S.1042-1048], die in manchen Punkten wesentlich stärker spezifiziert, werden Zellbilder mit leichter und mittlerer Dysplasie (CIN I, CIN II) als Gruppe III D und Zellbilder mit schweren Dysplasien bzw. einem *Carcinoma in situ* (CIN III) als Gruppe IVa eingestuft. Da die Daten der vorliegenden Studie zu ihrem Zeitpunkt nach der Münchner Nomenklatur II klassifiziert wurden, lassen wir die neue Nomenklatur außer Betracht.

Die folgende Tabelle zeigt die Gegenüberstellung der WHO-Nomenklatur, Bethesda-System und Münchner Nomenklatur II zur Beschreibung histologischer und zytologischer Befunde, sowie die diagnostische und therapeutische Empfehlung:

Histologie	Zytologie		Diagnostische und therapeutisches Vorgehen (bei Durchführung der Studie)
WHO-Nomenklatur (CIN - <i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>)	Bethesda-System (SIL - <i>Squamous intraepithelial lesion</i>)	Münchener Nomenklatur II	
Normales Zellbild	Normal/NILM	PAP I	Jährliche gynäkologische Vorsorge mit zytologischer Kontrolluntersuchung
Entzündliche Veränderungen	<i>(negative for intraepithelial lesion or malignancy)</i>	PAP II	Zytologische Kontrolluntersuchung, Zeitabstand je nach klinischem Befund, ggf. nach vorheriger Entzündungsbehandlung oder Hormongabe
Nicht-neoplastische Veränderungen, die mit einer HPV-Infektion assoziiert sind	ASC-US <i>(atypical squamous cells of undetermined significance)</i> ASC-H <i>(atypical squamous cells exclude)</i> AGC <i>(atypical glandular cells)</i>	PAP III	Kurzfristige zytologische Kontrolluntersuchungen, je nach klinischem Befund, ggf. sofortige histologische Abklärung
Leichte Dysplasie – CIN I	LSIL <i>(low squamous intraepithelial lesion)</i>	PAP IIID	Zytologische und ggf. kolposkopische Kontrolluntersuchung in 3 Monaten; bei Persistenz

Mäßige Dysplasie – CIN II	HSIL <i>(high squamous intraepithelial lesion)</i>		über 1 Jahr histologische Abklärung
Schwere Dysplasie oder <i>Carcinoma in situ</i> – CIN III	HSIL <i>(high squamous intraepithelial lesion)</i>	PAP IVa	Histologische Abklärung, ggf. nach kurzfristiger zytologischer Kontrolle
Schwere Dysplasie oder <i>Carcinoma in situ</i> , invasives Karzinom nicht auszuschließen		PAP IVb	
Invasives Karzinom	SCC <i>(Squamous cell carcinoma)</i>	PAP V	Histologische Abklärung

Tabelle 1: Gegenüberstellung der WHO/Bethesda/Münchener-Nomenklatur zur Beschreibung von histologischen und zytologischen Befunden (modifiziert nach der IDA-Leitlinie „Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion und präinvasiver Läsionen des weiblichen Genitale“ der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) et al., IDA 2010, S. 13f; Nauth 2014, S. 366; Kaufmann et al. 2013, S. 453)

1.3. Diagnostische Verfahren in der Früherkennung des Zervixkarzinoms

In diesem Abschnitt werden einzelne Techniken zur Früherkennung des Gebärmutterhalskrebses auf ihre Sensitivität (Prozentsatz richtig ermittelter Kranker unter allen Kranken), ihre Spezifität (Prozentsatz richtig ermittelter Gesunder unter allen Gesunden), ihren positiven Prädiktionswert (Prozentsatz der Vorhersage von Krankheitsdiagnosen, welche sich im Nachhinein als richtig darstellen) und/oder negativer Prädiktionswert (Prozentsatz der Vorhersage von zurecht als gesund diagnostizierten Befunden) hin näher erläutert.

1.3.1. Konventionelle Abstrichzytologie

Die konventionelle Abstrichzytologie ist die Standardmethode in der Früherkennung des Zervixkarzinoms und wird seit den 1970er Jahren in der Krebsvorsorge in Deutschland angewandt, derzeit mit ca. 16,2 Millionen Fällen pro Jahr [Schneider 2014]. Für alle Frauen ab dem 20. Lebensjahr wurden in der bis zum 31. Dezember 2019 geltenden Regelung die Kosten einmal pro Jahr für diese opportunistischen Kontrolluntersuchungen von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen [Kaufmann et al. 2013, S. 450; DKFZ 2015]. Seitdem gibt es für Frauen ab 35 Jahren eine modifizierte Regelung eines kombinierten *Screenings* mit Zytologie und HPV-Testung, während für Frauen unter 35 Jahren das bisherige jährliche zytologische *Screening* nach wie vor gültig ist. Laut der in 1992 in Kraft getretenen „Qualitätssicherungsvereinbarung Zervix-Zytologie“ der Kassenärztlichen Bundesvereinigung (KBV) ist jede fachlich befähigte gynäkologische Praxis in Deutschland dazu verpflichtet, der KBV jährlich Daten zur statistischen Erfassung bereitzustellen [KBV 2015, S. 7].

Das Zellmaterial wird mithilfe einer Bürste (z.B. *Cytobrush*, *Cervex Brush*) bzw. mit speziellen Holz- oder Plastikspateln (z.B. *Szalay-Spatel*) möglichst gezielt von der Transformationszone und von der Portiooberfläche entnommen. Das Zellmaterial wird dann gleichmäßig und dünn auf einen oder zwei Objektträger abgestrichen und mittels Spray oder Äthylalkohol sofort durch den Untersucher fixiert. Als Standardfärbung wird die Papanicolaou-Färbung eingesetzt. Bei der Mikroskopie werden diverse Kriterien der Zellen mikroskopisch beurteilt, insbesondere die Morphologie des Zellkerns und des Kernchromatins sowie die Kern-Plasma-Relation [Nauth 2014, S. 186ff].

Die Spezifität des PAP-Tests wird mit über 90% angegeben [Petru et al. 2011]. Für hochgradige zervikale Dysplasien variieren die Sensitivitätswerte zwischen 20% - 50% [Kaufmann et al. 2013, S. 452]. Falsch-negative Diagnosen gehen nach üblicher Schätzung in ca. zwei Drittel der Fälle auf einen sogenannten *Sampling Error* zurück, also auf Entnahmefehler oder -probleme, und zu ca. einem Drittel auf einen *Screening Error* zurück, d.h.

auf Übersehen oder Fehlinterpretieren diagnostisch wichtiger Zellen [Wilkinson 1990, S. 823; Baltzer 1999, S. 266; Cohn et al. 2001, S. 540].

1.3.2. Flüssigkeitsbasierte Zytologie (FBZ)

Die flüssigkeitsbasierte Zytologie ((FBZ), engl. *liquid based cytology* (LBC)), dient zur Herstellung von Dünnschichtpräparaten, daher wird es auch oft als Dünnschichtverfahren bezeichnet. Dieses Verfahren soll dazu dienen, dass es bei der Übertragung vom Entnahmeinstrument auf die Objektträger zu keinem Zellverlust kommt und dadurch die Ausbeute an Zellen sehr hoch ist. Zudem reduziert es Verunreinigungen durch Blut, Schleim, Leukozyten und Artefakte. Die Zellen werden ohne Überlagerung, idealerweise als einschichtiger *Monolayer*, auf kleine Flächen aufgebracht. Dies soll ein leichteres *Screening* und eine bessere Interpretation von Zellbildern erlauben. Aus dem Rest der Suspension können weitere Zusatzuntersuchungen, wie z.B. die Anwendung des HPV-Tests, der molekularen Tests (p16, Hauptkapsidprotein L1) und der bakteriologischen Untersuchungen durchgeführt werden, ohne die Patientin erneut einbestellen zu müssen. Allerdings hat die FBZ auch Nachteile. Die Beurteilung der entzündlichen Veränderungen und die bakterielle Flora sind mit ihr wenig oder gar nicht möglich. Desweiteren machen die Investitionen in die Gebrauchsmaterialien sowie in die Geräte es kostenintensiv [Nauth 2014 S. 376f; Bubendorf et al. 2011 S. 101f].

Seitens der *US Food and Drug Administration* (FDA) sind zwei LBC-Methoden zugelassen. Dazu zählen das *ThinPrep*- und das *SurePath*-System. Bei beiden Dünnschichttechniken erfolgt die Zellentnahme mit einem Lamellenträger oder Spatel. Das Zellmaterial wird nicht direkt wie beim konventionellen Abstrich auf einen Objektträger aufgetragen, fixiert und gefärbt, sondern in einen Behälter mit Fixierflüssigkeit eingebracht. Bei der erstgenannten Methode werden die Zellen durch Ansaugen mittels Mikroporenfilter konzentriert und durch Sedimentation auf den Objektträger aufgebracht. Bei der letzteren Methode werden die Zellen mittels Zentrifugation durch einen Dichtegradienten gereinigt, dann mittels erneuter Zentrifugation konzentriert und durch Sedimentation auf den Objektträger abgelagert [Nauth 2014 S. 376f; Bubendorf et al. 2011 S. 101f].

Die Überlegenheit dieser Methode im Vergleich zum konventionellen PAP-Test konnte in Studien hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität nicht eindeutig bewiesen werden [Siebert et al. 2003; Muth et al. 2003; Lellè et al. 2007; G-BA 2006; Arbyn et al. 2008]. In Deutschland ist die Methode innerhalb der gesetzlichen Krebsvorsorge erst seit dem 01.01.2020 zugelassen. Zuvor stand sie nur für Leistungen außerhalb des Vorsorgeprogrammes zur Verfügung. Dies bedeutet, dass die Mehrheit der in Deutschland beurteilten gynäkologischen Abstrichpräparate bislang konventionell aufgearbeitet wurde.

1.3.3. Kolposkopie

Das im Jahre 1924 vom deutschen Gynäkologen Hinselmann entwickelte Kolposkop ist eine Art Lupe mit Beleuchtung, welches durch die bis zur 20-fachen Vergrößerung eine genauere mikroskopische Untersuchung der *Portio uteri* erlaubt. Weiterentwickelte Geräte finden auch heute noch in der Praxis Anwendung. Bei einem vorangegangenen zytologischen PAP IIID-Befund (oder schwerwiegender) wird zur Abklärung dessen die Kolposkopie angewendet [Schneider et al. 2008, S. 151]. Sie ist also keine Methode im Rahmen des allgemeinen *Screenings*, sondern kommt erst bei auffälligen Befunden, welche ca. 1,5% der gynäkologischen Vorsorgeabstriche betreffen, als Abklärungsmethode zum Tragen. Da in dem seit dem 1. Januar 2020 geltenden neuen Abklärungsalgorithmus die Kolposkopie sehr an Gewicht gewonnen hat, soll das Vorgehen bei dieser Untersuchung kurz erläutert werden.

Die Schleimhaut des Gebärmutterhalses wird mit einer 3%- bzw. 5%igen Essigsäure betupft. Es zeigen sich je nach Ausprägung der Zellschichtungsstörung typische weißliche Veränderungen, die sich deutlich vom grauroten normalen Plattenepithel abheben. Als weiterführende Maßnahme wird die Schiller'sche Jodprobe angewendet. Wie in Abschnitt 1.1. erwähnt, werden durch die Applikation der 1%-igen wässrigen Jod-Jodkalium-Lösung (KJ₂) die glykogenhaltigen Zellen (normales Epithel) dunkel(braun) angefärbt, wohingegen die glykogenarmen Zellen (atypisches Epithel) sich nur leicht färben und gar ungefärbt bleiben [Baltzer 1999, S. 266f; Kühn 2011, S. 450]. Somit kann mithilfe der kolposkopischen Untersuchung unter Berücksichtigung der Jodaufnahme, der

Farbe, der Oberflächenbeschaffenheit, des Gefäßabstandes sowie der Begrenzung der identifizierten Läsion eine leichtgradige, mäßige oder schwergradige Läsion prognostiziert werden. Hilfreich ist die Kolposkopie auch bei chirurgischen Eingriffen, so dass gerade bei schwergradigen Läsion gezielter und gewebesparender vorgegangen werden kann [Schneider et al. 2008, S. 151].

Allerdings weist die Kolposkopie als singuläre Untersuchung sowohl eine sehr niedrige Sensitivität (etwa 10%) als auch eine niedrige Spezifität (hohe falsch-positiv Rate) auf, was unnötige invasive Abklärungen mit sich bringen kann. In Kombination mit der Zytologie jedoch können Sensitivitätswerte von über 90% erreicht werden [Petru et al. 2011, S. 75].

1.3.4. HPV-DNA-Nachweisverfahren

Die bewährten Methoden für den DNA-Nachweis einer HPV-Infektion sind der *Hybrid Capture 2* Test sowie Verfahren, die auf einer Polymerasekettenreaktion basieren.

Mit dem *Hybrid Capture 2* Test (HC2) werden zwei HPV-Gruppen identifiziert, zum einen die *low-risk* HPV-Typen sowie zum anderen die *high-risk* HPV-Typen. Einzelne HPV-Genotypisierungen sind hiermit nicht realisierbar. Die Sekretprobe mit unbekanntem und infiziertem Virus-DNA-Doppelstrang wird durch Hitzedenaturierung in Virus-Einzelstränge getrennt. Durch Hinzufügen markierter Einzelstrang-DNA-Bruchstücke mehrerer bekannter *low-risk* bzw. *high-risk* HPV-Typen binden diese mit den komplementären Basensequenzen aneinander und bilden sog. Hybride, welche durch spezifische Antikörper erfasst (engl. *capture*) werden. Mithilfe dieser markierten Antikörper leuchten die Hybride auf, so dass ein fluoreszenzoptischer HPV-Nachweis möglich wird [Nauth 2014, S. 382].

Bei der Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction* (PCR)) wird die doppelsträngige Virus-DNA, welche anschließend vervielfältigt wird, zunächst durch thermische Denaturierung in ihre Virus-Einzelstränge gespalten. Das Einsetzen hochspezifischer *Primer*, die aus verkürzten DNA-Einzelsträngen bestehen, ermöglicht das Bilden von Hybriden, da sie sich an die komplementären Virus-Einzelstränge anlagern. Die Vervielfältigung erfolgt mittels Hinzufügen von DNA-Polymerase, welches eine biochemische Kettenreaktion auslöst und somit zu millionenfachen Testmaterialien führt. Eine wiederholte Denaturierung sowie die Hinzugabe von markierten Virustyp-spezifischen Sonden lässt eine Vielzahl von Hybriden entstehen, die dann photometrisch leicht nachweisbar sind [Nauth 2014, S. 382].

Anhand eines sehr umfangreichen Patientenkollektivs – Daten von mehr als 60.000 Frauen aus Nordamerika und Europa – wiesen nach Cuzick et al. bei der Identifizierung von CIN II oder höhergradigen Läsionen über alle Altersgruppen die HPV-Testung und die Zytologie folgende Werte auf [Cuzick et al. 2006, S. 1098]:

	HPV-DNA-Test	Zytologie
Sensitivität	96,1%	53,0%
Spezifität	90,7%	96,3%
PPV	15,5%	20,3%

Tabelle 2: Werte der HPV-Testung und der Zytologie bei der Identifizierung von CIN II+ [Cuzick et al. 2006]

Wie aus der Tabelle 2 entnommen werden kann, erzielt ein HPV-DNA-Test eine hohe Sensitivität. Trotz dieser hohen Sensitivität weisen einige Studien darauf hin, dass je nach Grad der Läsion, in 5%-30% der Fälle keine viralen Infektionen identifiziert werden können [de Cremoux et al. 2003, S. 493]. Eine vom gemeinsamen Bundesausschuss an das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) in Auftrag gegebene Studie konnte weder eine Befürwortung noch eine Ablehnung bzgl. des HPV-DNA-Tests als Primär-*Screening* aussprechen [IQWiG 2011]. Im Rahmen der Reform der gynäkologischen Krebsvorsorge zum 1. Januar 2020 sind nun für Frauen ab einem Alter von 35 Jahren der HPV-DNA-Test Teil des *Screening*-Programms geworden.

1.3.5. L1 Kapsidprotein-Nachweisverfahren

Beim L1-Tumormarker-Nachweis erfolgt eine immunzytochemische Bestimmung des Hauptkapsidproteins L1 des Humanen Papillomavirus (HPV), so dass mithilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern dieses L1 Hüllprotein in dysplastischen Zellen farblich nachgewiesen wird. Das *late region* ORF L1 des HPVs wird während der aktiven Infektionsphase im Stadium der Virusreplikation (Stadium der CIN I und CIN II) synthetisiert und somit für das Immunsystem als Antigen zur Verfügung gestellt (s. auch Abschnitt 1.2.2. und 1.2.3.). Von dieser Eigenschaft macht das Kapsidprotein-Nachweisverfahren Gebrauch, so dass die Remission bzw. Progression der Dysplasie bestimmt werden kann. Bei einem L1-positiven Testergebnis geht man von einer Stimulation des Immunsystems mit einer anschließenden Remission der Veränderung aus. Bei einem L1-negativen Testergebnis schließt man auf eine fehlende Stimulation des Immunsystems und somit auf ein Risiko, dass sich die Dysplasie ungehindert zum Karzinom weiterentwickeln kann. Jedoch kann auch bei einer schweren Dysplasie (CIN III) ein L1-positives Testergebnis erfolgen, sodass dieses Verfahren nicht immer eindeutig ist [Nauth 2014, S. 383].

In der prospektiven internationalen Multi-Center-Studie von [Mehlhorn et al. 2013] wurde die prognostische Relevanz des L1 Kapsidproteins mit cytoactiv an 801 HPV *high-risk* positiven Läsionen mit leichten bzw. mäßigen Dysplasien (479 LSIL und 322 HSIL) während einer Nachbeobachtungszeit von 54 Monaten untersucht. Die klinischen Endpunkte wurden histologisch als CIN III+ Progression, als CIN I/II für die stabile Erkrankungen und wiederholter negativer PAP-Abstriche als spontan klinische Remission bestätigt. Der Unterschied der klinischen Ergebnisse von HPV-L1-negativen und HPV-L1-positiven Fällen war statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$), unabhängig von der Einstufung in die leichte (LSIL) und die mäßige Dysplasie (HSIL). Insgesamt hatten 296 von 471 L1-positiven LSIL/HSIL-Fällen eine spontane klinische Remission, aber nur 38 von 330 L1-negativen Fällen eine spontane klinische Remission. Dies ist eine gut 5-fach höhere Wahrscheinlichkeit für die klinische Remission der L1-positiven Fälle im Vergleich zu den L1-negativen Fällen (ca. 63% versus 12%). Ferner entwickelten sich nur 73 von 471 L1-positiven, aber 193 von 330 L1-negativen Fällen zu CIN III+. Dies ist ein fast 4-fach höheres Progressionsrisiko für L1-negative Fälle (ca. 15% versus 58%). Die Rate

der klinischen Remission war innerhalb der L1-positiven LSIL Fälle am höchsten (224 von 328, d.h. ca. 68%), gefolgt von den L1-positiven HSIL-Fällen (72 von 143, d.h. ca. 50%) und am zweitniedrigsten innerhalb der L1-negativen LSIL Fälle (29 von 151, d.h. ca. 19%) sowie am niedrigsten innerhalb der L1-negativen HSIL Fälle (9 von 179, d.h. ca. 5%). Entsprechend diesen Ergebnissen lag die Progressionsrate innerhalb der L1-positiven LSIL Fälle mit ca. 9% (30 von 328) am geringsten, gefolgt von den L1-positiven HSIL Fällen mit ca. 30% (43 von 143) sowie von den L1-negativen LSIL Fällen mit ca. 52% (78 von 151) und mit ca. 64% (115 von 179) innerhalb der L1-negativen HSIL Fälle am höchsten. Dies bedeutet, dass die L1-negativen LSIL-Fälle gegenüber den L1-positiven Fällen ein gut 5-mal höheres Progressionsrisiko zu CIN III+ sowie die L1-positiven HSIL-Fälle gegenüber den L1-negativen HSIL-Fällen eine fast 10-fach höhere Remissionsrate hatten. Dies zeigt, dass LSIL und HSIL Mischungen unterschiedlicher Stadien sind und dass die Morphologie selbst nicht vorhersagt, welche Läsion zurückgehen oder fortschreiten wird. Interessanterweise haben die L1-positiven HSIL-Fälle (50%), eine 2,6-fach höhere Remissionswahrscheinlichkeit und ein 1,7-fach niedrigeres Progressionsrisiko als die L1-negativen LSIL-Fälle (19%, $p < 0,001$). Die stabile Erkrankung wurde bei ca. 22% (102 von 471) L1-positiven und bei 30% (99 von 330) L1-negativen Fällen gefunden. Der Prozentsatz der stabilen Erkrankung war unabhängig vom L1-positiven bzw. negativen Status sowie der LSIL bzw. der HSIL Klassifikation und reichte von ca. 20% bis ca. 31% [Mehlhorn et al. 2013].

1.3.6. DNA-Bildzytometrie

Zur Bestimmung von Malignität bzw. der Dignität zervikaler Schleimhautveränderungen ist die DNA-Bildzytometrie eine sehr aussagefähige Methode, die aber nur an Schwerpunkten zum Einsatz kommt. Dabei wird die numerische DNA-Aneuploidie als Marker genutzt, um bei dysplastischen und zweifelhaften zytologischen Befunden die Krebsentwicklung vorherzusagen. Dafür müssen die konventionellen zytologischen Abstrichpräparate entfärbt und spezifisch nach Feulgen angefärbt werden. Nach spezifischer Anfärbung der DNA wird die optische Dichte und Größe von etwa 300 morphologisch auffälligen Zellen gegenüber von etwa 30 normalen Referenzzellen im selben Präparat mittels eines TV-Bildanalyseverfahrens im Mikroskop gemessen und grafisch in einem sog.

DNA-Histogramm dargestellt. Das DNA-Histogramm gibt Aufschluss darüber, ob ein numerischer euploider, polyploider oder aneuploider Chromosomensatz vorliegt [Böcking et al. 1999, S. 28f.]. Bei einer DNA-Aneuploidie besteht die Wahrscheinlichkeit von ca. 91% für Progression [Böcking 1990], während bei einer DNA-euploider oder einer DNA-polyploider Werteverteilung mit einer 85%igen Wahrscheinlichkeit eine Regression eintreten dürfte [Nauth 2014, S. 380f.]. Für die genaue Vorhersage eines Plattenepithelkarzinoms wird für CIN I und CIN II ein positiver Prädiktionwert von 84% und für die Vorhersage reaktiver Veränderungen ein negativer Prädiktionwert von 86% angegeben [Böcking et al. 1999, S. 31].

1.3.7. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungsverfahren (FISH)

Im Vergleich zur DNA-Bildzytometrie ist die *Fluoreszenz-in-situ*-Hybridisierung in der Diagnostik empfindlicher [Bubendorf et al. 2011], aber wesentlich aufwendiger und letztendlich auch teurer. Bei der *Fluoreszenz-in-situ*-Hybridisierung werden Genomabschnitte mit spezifischen DNA-Sonden markiert und mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs in einzelnen Zellen nachweisbar gemacht. Der Virus-DNA-Doppelstrang wird durch Hitzedenaturierung in Virus-Einzelstränge gespalten. Durch ein Hybridisierungsverfahren bindet die mit Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Sonde der ebenfalls denaturierten FISH-Probe, an die komplementären Stellen des Virus-DNA-Einzelstrangs an. Die dadurch entstandenen hybridisierten fluoreszenzmarkierten DNA-Sequenzen können mittels Fluoreszenzmikroskop mit einem entsprechenden Fluoreszenzfiltern dargestellt und gezielt auf die Anzahl der Genkopien ausgewertet werden. Ein FISH-Verfahren mit Sonden gegen HPV-DNA bestimmt die HPV-Typen 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66 sowie 82 [Savic et al. 2007].

Das *hTERC* als RNA-Anteil der humanen Telomerase, welche am Chromosomabschnitt 3q26 kodiert wird, dient zur Telomerstabilität sowie dessen Längenregulierung. Das Gen *cMYC* als Teil des Chromosoms 8 (8q24) gilt als Onkogen und begünstigt über die Tumorentstehung. Unter simultaner Verwendung mehrerer Fluoreszenz-Farbstoffe kann die Kopienzahl der Genkopien beider Gene in identischen Zellen bestimmt werden. Eine

hohe Genkopienzahl deutet dabei auf eine Progression einer CIN-Läsion zu einem invasiven Karzinom hin [Obermann et al. 2013, S. 424ff; Kübler et al. 2014, S. 825 f]. Unter anderem zeigt die *TERC*-Analyse eine höhere Sensitivität (90,0%) und Spezifität (89,6%) gegenüber der konventionellen Zytologie (Sensitivität 84,0%, Spezifität 64,3%) [Obermann et al. 2013, S. 424ff].

Trotz dieser Ergebnisse hat sich bisher das FISH-Verfahren in der Diagnostik an der *Cervix uteri* nicht durchgesetzt.

1.3.8. Histologie

Bei auffälligen Zytologie- bzw. Kolposkopiebefunden mit Verdacht auf eine zervikale Präkanzerose oder gar ein manifestes Karzinom (Pap IVa und höher), in manchen Fällen auch bei rezidivierenden mittleren Dysplasien (Pap IIID bzw. jetzt nach Münchener Nomenklatur III: Pap IIID-2), ist eine histologische Abklärung indiziert. Dies geschieht mittels unterschiedlicher bioptischer Verfahren, wie z.B. der Knipsbiopsie unter kolposkopischer Sicht, der Portioabschabung, der endozervikalen Kürettage oder einem der verschiedenen Konisationsverfahren. Das letztere Verfahren dient nicht nur zur diagnostischen Klärung, sondern auch als therapeutische Maßnahme. Bei dem ambulant durchgeführten Eingriff wird der Konus mittels Skalpells, Laser oder elektrischer Schlinge herausgeschnitten und in Formalinlösung fixiert.

Bei der Skalpellkonisation ist es von Vorteil, dass die Konusränder histologisch genau diagnostizierbar sind. Nachteilig sind hingegen unter anderem eventuelle Nachblutungen und/oder Infektionen.

Für die Laserkonisation spricht, dass durch die Anwendung des Laserstrahls das umliegende Gewebe geringer geschädigt wird. Die Schnittländer des ausgeschnittenen Konus sind blutungsfrei und können dadurch schneller abheilen. Allerdings ist die histologische

Beurteilung eingeschränkt, da der Laserstrahl das zu entfernende Gewebe an den Schnitt-
rändern thermokoaguliert und entsprechend morphologisch verändert.

Bei der Hochfrequenz-Schlingenkonisation (*Large Loop Excision of Transformation Zone* (LLETZ), *Loop Electric Excision Procedure* (LEEP)), die heute häufig angewandt wird, wird das zu entfernende Gewebe mittels dünner elektrischer Schlinge, die sich der Größe der Portio und dem zu entfernenden Gewebebezirk anpasst, entfernt. Bei geeigneter Handhabung ist die histologische Diagnose der Schnittländer trotz der Hitzenekrose beurteilbar [Baltzer 1999, S. 268ff; Baltzer et al. 2004, S. 536f].

Zur weiteren histologischen Untersuchung wird das gewonnene Präparat unabhängig vom konkreten Entnahmeverfahren an den Pathologen weitergegeben und dort nach den üblichen Regeln des Faches aufgearbeitet.

In der Dissertation von Müller aus dem Jahre 2015 wurden die zytologischen und histologischen Befunde (485 Biopsien und 105 Konisaten) in der Gebärmutterhalskrebsdiagnostik miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Korrelation zwischen der Zytologie und der Histologie bei der Konisation gegenüber dem Vergleich zur Biopsie höher waren (ca. 57% versus ca. 43%), dies galt sowohl für die Fälle von CIN I+ bei PAP IIID+ (ca. 90% versus ca. 80%) als auch für die zugehörigen komplementären Fälle, also ohne CIN Befund bei PAP IIID+ (ca. 10% versus 20%). Lediglich für den Fall von CIN III+ bei PAP IVa/IVb/V lagen die Werte gleich auf (ca. 89%) [Müller 2015, S. 45f].

In Analogie wurden in einer früheren Studie von Mangold und Nauth aus dem Jahre 2008 zytologisch vorbefundete Fälle der PAP-Gruppen IVa/IVb (CIN III-Verdachtsfälle) mit den histologischen Ergebnissen der Konisation und der Biopsie miteinander verglichen (468 Proben). Dabei stellte sich heraus, dass auch hier die Treffsicherheit einer Konisation gegenüber einer kolposkopisch gesteuerten Portiobiopsie überlegen war (ca. 79% versus 27%) [Mangold und Nauth 2008].

1.4. p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec[®] PLUS)

In der hier vorgelegten Studie geht es um den Stellenwert der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung Immunzytologie als zu erprobende weitere diagnostische Methode. Deswegen sollen jetzt das Prinzip und der biologische Hintergrund dieser Anwendung vorgestellt werden. Da sich der Handelsname des Tests, CINtec[®] PLUS, weitgehend als einfachere Bezeichnung durchgesetzt hat, soll diese im Folgenden verwendet werden. Prinzipiell ist es aber auch möglich, beide einzelnen Schritte der Testung durch anderweitig erworbene Antikörper nacheinander durchzuführen.

Das CINtec[®] PLUS-Kit ist ein immunzytochemischer Test, der über die gleichzeitige Doppelfärbung des Zellzyklusinhibitors p16^{INK4a} und des Proliferationsmarkers Ki-67 in einer oder mehrerer Zervixzellen im Abstrich Veränderungen nachweisen kann, von denen man sich verspricht, eine verlässliche Aussage über eine mögliche Progression der zugrunde liegenden Läsion zu erhalten.

Nach Daten neueren klinischer Studien weist das CINtec[®] PLUS-Verfahren sowohl eine hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität auf. Es dient zur Identifizierung von hochgradigen zervikalen Dysplasien (CIN II+) innerhalb folgender Patientengruppen:

- der Gruppe von Frauen mit abnormen PAP-Befunden,
- der Gruppe von Frauen mit einem ASC-US-Befund und/oder LSIL-Befund, was nach neuer Münchner Nomenklatur III den Gruppen II-p und IID1 entspricht,
- der Gruppe von Frauen mit negativem PAP-, aber positivem HPV-Befund.

In Kapitel 4 wird genauer auf die oben genannten Werte zur Treffsicherheit eingegangen.

1.4.1. p16^{INK4a}

Durch die Wechselwirkung des Onkoproteins E7 mit dem Retinoblastomprotein (pRB) wird die Funktion von pRB in den infizierten Zellen gehemmt. Die Hauptaufgabe des pRB in normalen Zellen ist die Inhibition des zyklinabhängige Kinaseinhibitors p16^{INK4a} [Khleif et al. 1996]. Dieser transkriptionshemmende Mechanismus wird durch die Aktivität des Onkoproteins E7 herunter reguliert. Infolge dessen kommt es zu einer starken Überexpression von p16^{INK4a} in HPV-assoziierten Läsionen. Daher ist p16^{INK4a} ein geeigneter Marker für die onkogene Aktivität des *high-risk* HPV E7 in differenzierten Zellen der Basal- und Parabasalzellschicht. Im Gegensatz dazu ist in normalen Zellen der *Cervix uteri* p16^{INK4a} immunzytochemisch nicht nachweisbar [Klaes et al. 2001].

1.4.2. Ki-67

Das Ki-67-Protein wurde im Jahre 1983 von Gerdes et al. entdeckt und ist durch den monoklonalen Antikörper-Prototyp Ki-67 definiert [Gerdes et al. 1983], der durch Immunisierung von Mäusen mit Kernen der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L428 erzeugt wurde. Der Name stammt von dem Ausgangsort (Kiel) und dem 67. Antikörperklon einer Versuchsreihe ab. Trotz erfolgter Genstrukturanalyse ist über die funktionelle Bedeutung des Ki-67-Proteins während der Zellproliferation insgesamt wenig bekannt. Jedoch ist es unbestreitbar, dass die Ki-67-Protein-Expression und die Zellproliferation eng miteinander verknüpft sind [Scholzen et al. 2000]. Nach detaillierter Zellzyklusanalyse ist bekannt, dass das Ki-67-Antigen in den Zellkernen der postmitotischen Wachstumsphase, Synthesephase, Postsynthesephase (G₁-, S- und G₂/M-Phasen) des Zellzyklus sowie in der Mitose exprimiert wird. Jedoch ist es in den ruhenden Zellen der G₀-Phase (Ruhephase) nicht vorhanden. Während der übrigen Zellzyklusphasen (G₁, S und G₂) kann das Ki-67-Antigen ausschließlich im Zellkern nachgewiesen werden. In der Mitose wird der Großteil des Proteins auf die Oberfläche der Chromosomen verlegt [Gerdes et al. 1984]. Da das Ki-67-Antigen in allen proliferierenden Zellen vorhanden ist, macht die Anwesenheit dieser Struktur es zum ausgezeichneten Marker zur Bestimmung der Wachstumsfraktion ei-

ner gegebenen Zellpopulation [Scholzen et al. 2000]. Aus diesem Grund werden die Antikörper gegen das Ki-67 Protein zunehmend als prognostische Einschätzung in verschiedenen Typen von humanen Neoplasien verwendet [Brown et al. 1990].

1.5. Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Leistungsfähigkeit der kombinierten CINtec[®] PLUS-Methode an bekannten Zervix-Abstrichen am Patientengut des Schwerpunktes Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu ermitteln. Untersucht wurden dazu insgesamt 350 zytologische Proben, die insgesamt in sechs Krankheitsgruppen (keine Dysplasie, leichte Dysplasie, mäßige Dysplasie, schwere Dysplasie, *Carcinoma in situ* und invasives Karzinom) unterteilt wurden. Zu allen Fällen der Krankheitsgruppen lagen die zeitnahen histologischen Vergleichsergebnisse aus Probeexzisionen oder Konisationen vor. Dabei wurde eine Frist von 90 Tagen nicht überschritten, da man annimmt, dass innerhalb dieses Zeitraumes an der zugrundeliegenden Läsion keine signifikanten biologischen Veränderungen stattfinden.

Die Ergebnisse der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung wurden mit den Befunden der Zytologie und der Histologie korreliert und auf statistische Kenngrößen wie Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Prädiktionswert bezogen.

Zu der Studie liegt ein positives Ethikvotum seitens der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Nr. 4267 vom 17.05.2013) vor.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv aus 350 Fällen stammt aus einer im Vorfeld durchgeführten Studie, die sich mit der Korrelation zytologischer und histologischer Befunde in der Gebärmutterhalskrebsdiagnostik beschäftigte [Müller 2015]. Es handelt sich um Abstrichpräparate der *Cervix uteri* die im Rahmen der Dysplasiesprechstunde der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zwischen Dezember 2008 und August 2012 angefertigt und am Schwerpunkt Cytopathologie ausgewertet wurden. Dabei wurden die Diagnosen gemäß der Gruppeneinteilung der seinerzeit gültigen Münchner Nomenklatur II [Nauth 2014, S. 366] kategorisiert. D.h. wie folgt:

- | | |
|----------------------------|----------------------|
| • keine Dysplasie | Gruppe I / Gruppe II |
| • leichte Dysplasie | Gruppe IIID |
| • mäßige Dysplasie | Gruppe IIID |
| • schwere Dysplasie | Gruppe IVa/b |
| • <i>Carcinoma in-situ</i> | Gruppe IVa/b |
| • Karzinom | Gruppe V |

Sämtliche zytologischen PAP-Befunde sowie die Ergebnisse der zeitnahen histologischen Befunde lagen vor der Durchführung dieser Studie bereits vor. Eine histologische Klärung erfolgte häufig zeitgleich mit der zytologischen Untersuchung oder maximal 90 Tage danach. Somit lagen bei den 350 Abstrichen jeweils der PAP-Befund sowie die Ergebnisse der Probeexzisionen (PE) vor. Bei 184 Patientinnen wurde zusätzlich jeweils eine Konisation durchgeführt.

2.1.1. Altersverteilung des Patientenkollektivs

Bei den Patientinnen handelt es sich um Frauen im Alter zwischen 16 und 88 Jahren, wobei das Lebensalter zum Zeitpunkt des jeweiligen ersten zytologischen Befundes erfasst wurde. Die Abb. 10 zeigt die Altersverteilung dieser Patientinnen.

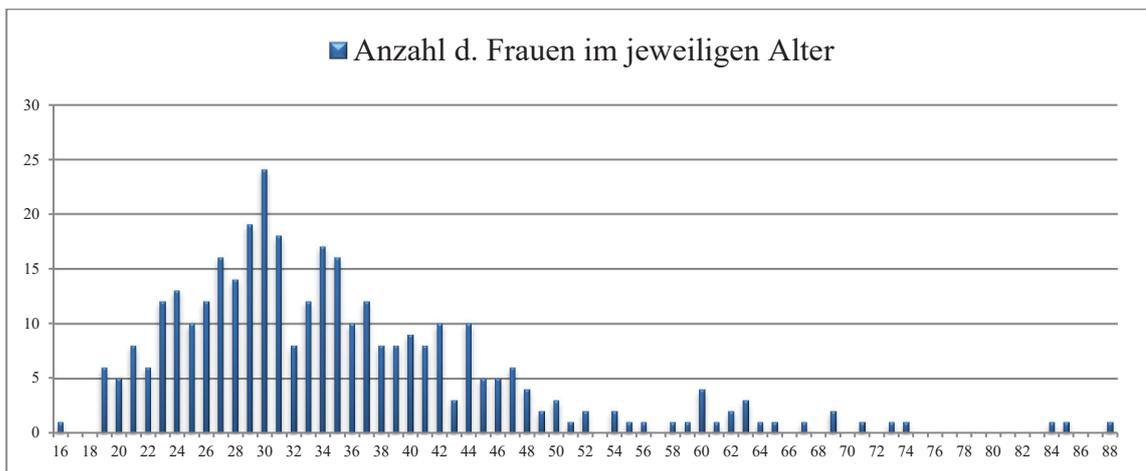


Abb. 10: Patientinnen sortiert nach Alter; Abszisse: Patientenalter; Ordinate: Patientenzahl

Die meisten Frauen waren zwischen 27 und 35 Jahre alt. Dabei lag der Modalwert der Altersverteilung bei 30 Jahren. Nur 6,0% (21 von 350) der Probandinnen waren 60 Jahre oder älter und lediglich eine Patientin war minderjährig.

Ferner veranschaulicht die untere Abb. 11 den Alters-Mittelwert von 35,2 Jahren sowie den Alters-Median von 33,0 Jahren der insgesamt 350 Patientenfälle. Die Standardabweichung beträgt 11,7 Jahre.

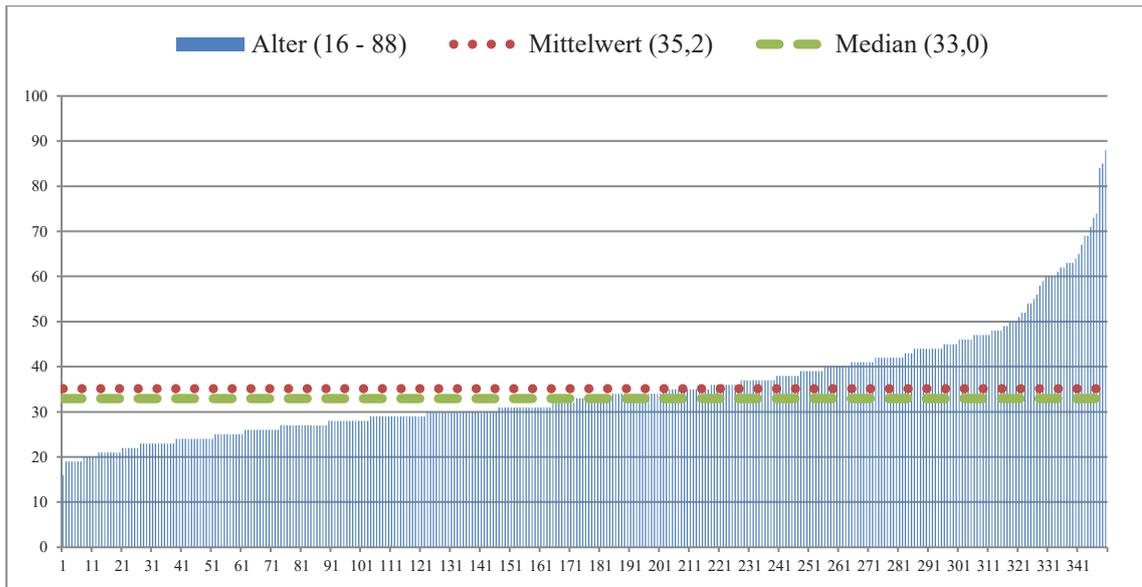


Abb. 11: Präparate sortiert nach Patientenalter; Abszisse: Präparate; Ordinate: Patientenalter

2.2. Durchführung der immunzytochemischen Untersuchung

Die gleichzeitige Immunfärbung der zervikalen zytologischen Proben für p16^{INK4a}/Ki-67 wurde mit dem CINtec[®] PLUS Kit (Roche mtm Laboratorien AG) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Das Kit wurde entwickelt, um eine zweistufige immunzytochemische Färbeprozedur an zervikalen zytologischen Proben durchzuführen. Die gebrauchsfertige Primär-Antikörperlösung, welche zum Nachweis der Antigene dient, besteht aus einem monoklonalen Maus-Antikörper (Klon E6H4), welcher gegen das menschliche p16^{INK4a}-Protein gerichtet ist, und einem monoklonalen Kaninchen-Antikörper (Klon 274-11 AC3), der gegen das menschliche Ki-67-Protein gerichtet ist. Die verwendeten gebrauchsfertigen Visualisierungsreagenzien umfassen zum einen ein Polymer-Reagenz mit konjugierter Meerrettichperoxidase und Ziege-Anti-Maus-Fab'-Antikörperfragmenten (HRP) und zum anderen ein Polymer-Reagenz mit konjugierter alkalischer Phosphatase und Ziege-Anti-Kaninchen-Fab'-Antikörperfragmenten (AP). Die Antikörper-Chromogen-Reaktionen, d.h. die HRP-vermittelte Umwandlung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Chromogen und die AP-vermittelte Umwandlung von *Fast Red*-Chromogen, führen zur braunen Färbung an den p16-Antigenstellen und zur roten Färbung an den Ki-67-Antigenstellen. Nach der Gegenfärbung mit alkoholfreiem Hämatoxylin werden die Präparate in einem Zwei-Schritt-Verfahren eingedeckt. Um das Verblässen

des *Fast Red* Signals zu verhindern, müssen zunächst die Proben mit dem im Kit enthaltenen wässrigen Mittel eingedeckt werden. Nach Trocknung werden die Objektträger mit einem Deckgläschen versehen und anschließend lichtmikroskopisch ausgewertet.

Ein Arbeitsvorgang mit 20 Objektträgern sowie einer Positivkontrolle dauert ca. vier Stunden (genauer: 226 Minuten).

2.2.1. Entfernung der Deckgläser

Zur Vorbereitung des Testverfahrens werden die nach Papanicolaou gefärbten Präparate in eine 96%-ige Xylol-Lösung eingelegt, so dass sich die Deckgläser in der Regel ohne Zellverlust eigenständig vom Objektträger lösen. Bei der Verwendung von älteren Präparaten (> 1 Monat) gelingt dieses häufig erst innerhalb von drei bis fünf Tagen.

2.2.2. Vorbereitung der Reagenzien

Um einen Test durchführen zu können, sollten die Reagenzien in ausreichenden Mengen angesetzt und auf eine Raumtemperatur von etwa 20°C-25°C gebracht werden.

Zur Herstellung der Demaskierungslösung (*Epitope Retrieval Solution*) und des Waschpuffers (*Wash Buffer*) werden die 10-fach konzentrierten Lösungen mit destilliertem Wasser oder entionisiertem Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt und in entsprechend großen Flaschen aufbewahrt. Bei dieser Studie wurde ausschließlich destilliertes Wasser verwendet.

Für das Ansetzen der DAB-Gebrauchslösung werden zunächst 1 ml DAB-Substratlösung in ein Reagenzgefäß gegeben und ein Tropfen (25µl-30µl) des DAB-Chromogens hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die angesetzte Lösung ist etwa acht Stunden haltbar. Die

Fast Red Gebrauchslösung wird hingegen kurz vor dem Färbeverlauf angesetzt. Dadurch wird die Farbintensität gewährleistet und die Sensitivität aufrechterhalten. Einem Milliliter der einer Naphthol-Phosphat-Substrat-Lösung wird ein Tropfen (40µl-45µl) des *Fast Red*-Chromogens beigemischt und ebenfalls gemischt.

2.2.3. Rehydrierung

Um die restlichen Rückstände des Eindeckmediums zu entfernen, werden vor der Antigen-Demaskierung alle zytologischen Proben zunächst für 15 Minuten in frischem Xylol eingelegt. Danach werden sie in eine absteigende Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten gegeben und im destillierten Wasser rehydriert. Alle Schritte, die im Folgenden zusammenfassend aufgeführt sind, sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden:

1. Inkubation der Präparate für 15 Minuten in frischem Xylol, um restliche Rückstände des Eindeckmediums zu entfernen
2. Inkubation der Präparate für 5 Minuten in 99% Ethanol
3. Inkubation der Präparate für 5 Minuten in 96% Ethanol
4. Inkubation der Präparate für 5 Minuten in 70% Ethanol
5. Inkubation der Präparate für 5 Minuten in 50% Ethanol
6. Inkubation der Präparate für 5-20 Minuten im destillierten Wasser

2.2.4. Epitopdemaskierung unter Verwendung des Wasserbades

Thermoresistente Küvetten werden mit der verdünnten Demaskierungslösung (*Epitope Retrieval Solution* (10x) mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt) in ein Wasserbad gegeben und auf mindestens 95°C erwärmt. Die Deckel müssen während der thermischen Behandlung verschlossen sein, um etwa das Eindringen von Wasser aus dem Wasserbad, die Verdampfung der Demaskierungslösung sowie die Senkung der Temperatur in den Küvetten zu vermeiden. Die Temperaturkontrolle erfolgt mit einem digitalen

Messgerät. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur werden die Objektträger mitsamt einer Positivkontrolle (*Cintec Control Slide*), welches zuvor für 5 bis 20 Minuten im destillierten Wasser inkubiert worden ist, in die Küvetten mit der vorgewärmten Desmaskierungslösung eingelegt. Die Messung der Inkubationszeit von 10 (+/-1) Minuten bei 95°C-99 °C findet erst dann statt, wenn die Desmaskierungslösung in den Küvetten eine Temperatur von mindestens 95°C erreicht hat. Nach der thermischen Behandlung werden die Küvetten aus dem Wasserbad herausgeholt. Um das Abkühlen der Desmaskierungslösung für 20 (+/- 1) Minuten bei Raumtemperatur zu beschleunigen, werden anschließend die Küvettendeckel entfernt. Ist die Temperatur auf 50°C oder geringer gesunken, werden die Objektträger in eine mit Waschpuffer (*Wash Buffer* (10x) mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt) gefüllte Küvette gegeben und für 5 Minuten inkubiert.

2.2.5. Färbeprotokoll

Die konventionellen Zytologiepräparate werden mit 300µl Reagenz pro Objektträger benetzt. Die Färbung sollte in einer feuchten Umgebung durchgeführt werden, um die Austrocknung der Präparate zu vermeiden. In den folgenden Färbeschritten werden die Objektträger jeweils bis zu dreimal in frischem Waschpuffer gespült (der Färbeporgang beträgt insgesamt ca. 2,5 Stunden):

1. Waschpuffer	5	Minuten
2. Peroxidase-Blockierungsreagenz	5	Minuten
3. Waschpuffer	5	Minuten
4. Primär-Antikörperlösung (p16 ^{INK4a} /Ki-67)	30	Minuten
5. Waschpuffer	5	Minuten
6. Visualisierungsreagenz HRP	15	Minuten
7. 3x Waschpuffer	je 5	Minuten
8. Visualisierungsreagenz AP	15	Minuten
9. 3x Waschpuffer	je 5	Minuten
10. DAB	10	Minuten
11. Destilliertes Wasser	5	Minuten
12. Waschpuffer	5	Minuten

13. <i>Fast Red</i>	15	Minuten
14. Waschpuffer	5	Minuten
15. Destilliertes Wasser	5	Minuten

2.2.6. Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Zur Gegenfärbung werden die Präparate zunächst für ca. 30 Sekunden in eine alkoholfreie Hämatoxylinlösung gestellt. Anschließend erfolgt für 30 bis 120 Sekunden die Inkubation in einer Küvette mit Leitungswasser. Unter laufendem Leitungswasser werden sie mehrmals gespült, bis keine Farbrückstände mehr sichtbar sind. Danach werden sie kurz in destilliertes Wasser gestellt.

2.2.7. Eindecken im Zwei-Schritt-Verfahren

Das Eindeckverfahren wird in zwei Schritten durchgeführt. Somit erreicht man eine hohe Sensitivität und verhindert das Ausbleichen des *Fast Red*-Chromogens. Nach Gegenfärbung werden die Objektträger aus dem destilliertem Wasser herausgenommen. Man lässt die überschüssige Flüssigkeit ablaufen und wischt die Unterseite mit einem Papiertuch ab. Acht Tropfen CIntec[®] PLUS Mount werden blasenfrei auf die Objektträger aufgebracht, bis sie vollständig bedeckt sind. Danach werden die Objektträger in horizontaler Lage über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.8. Deckglas

Um sie für die Auswertung zu konservieren, werden nach vollständiger Trocknung des flüssigen Eindeckmediums die Objektträger mit Deckgläsern versehen.

2.3. Auswertung

Das CINtec® PLUS-Verfahren kann sowohl ein positives, als auch ein negatives Testergebnis zur Folge haben. Der Nachweis von einer singulären, morphologisch auffälligen plattenepithelialen Zelle, die sowohl eine braune zytoplasmatische, als auch eine rote Kernfärbung zeigt und somit eine simultane p16^{INK4a}- und eine Ki-67-Expression aufweist, wird als positives Testergebnis definiert. Finden sich keine morphologisch auffälligen Plattenepithelien mit simultaner Doppelfärbung, wird das Färberesultat als negativ eingestuft.

Dabei wurde bei jedem Färbedurchgang eine im CINtec® PLUS-Kit enthaltene Positivkontrolle mitgeführt, so dass die Testvorgänge (unabhängig vom Testergebnis (positiv oder negativ)) auf ihre Richtigkeit verifiziert werden konnten. Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

2.4. Datenerfassung und statistische Analyse

Die Dokumentation der Resultate erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Office Excel. Anhand dessen wurden alle wichtigen Angaben bezüglich der Patientinnen, wie Name, Geburtsdatum, sowie die Ergebnisse von Zytologie, Probeexzision, Konisation und CINtec® PLUS erfasst.

Zusätzlich wurden zwei zusätzliche Kategorien pro Patientin hinzugefügt, die im klinischen Alltag und auch in der wissenschaftlichen Literatur üblich sind und an denen die Ergebnisse der Zytologie häufig gemessen werden:

CIN II+	Histologische Veränderungen, die mindestens einer CIN II entsprechen (CIN II, CIN III, Karzinom)
---------	--

CIN III+ Histologische Veränderungen, die mindestens einer
CIN III entsprechen (CIN III, Karzinom)

Die sich anschließende statistische Analyse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Um die diagnostische Genauigkeit eines Verfahrens (hier: CINtec[®] PLUS) prüfen zu können, wurden die möglichen Ergebnisse/Vergleiche der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung, der Zytologie, der Probeexzision oder der Konisation im Sinne der Vierfeldertafel (Kreuztafel) zusammengefasst.

	Positiv (krank)	Negativ (gesund)
Positives Testergebnis	Richtig positiv (a)	Falsch positiv (b)
Negatives Testergebnis	Falsch negativ (c)	Richtig negativ (d)

Tabelle 3: Vierfeldertafel (modifiziert nach Sauerbrei et al. 2009)

Als Messgrößen wurden folgende Parameter ermittelt:

- Sensitivität (Prozentsatz richtig ermittelter Kranker unter allen Kranken):

$$\text{SEN} = [a / (a + c)]$$

- Spezifität (Prozentsatz richtig ermittelter Gesunder unter allen Gesunden):

$$\text{SPEZ} = [d / (b + d)]$$

- positiver Prädiktionswert (Prozentsatz der Vorhersage von Krankheitsdiagnosen, welche sich im Nachhinein als richtig darstellen):

$$\text{PPV} = [a / (a + b)]$$

- negativer Prädiktionswert (Prozentsatz der Vorhersage von zurecht als gesund diagnostizierten Befunden):

$$\text{NPV} = [d / (c + d)].$$

Des Weiteren wurde, um die Stabilität und die Zuverlässigkeit des Testverfahrens prüfen zu können, die Konkordanz (Übereinstimmung) zwischen den Befunden der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung, Zytologie, Probeexzision und Konisation untereinander bestimmt. Die möglichen Ergebnisse zu diesem Zusammenhang wurden mit Hilfe von Cohens Kappa-Koeffizienten in einer symmetrischen n x n-Matrix (Kreuztabelle) erfasst. Der Kappa-Koeffizient ist wie folgt definiert:

$$\kappa = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e},$$

wobei P_0 der gemessene Übereinstimmungswert (Konkordanzrate) und P_e der zufällig erwartete Übereinstimmungswert ist. Dieser Koeffizient gibt die Stärke der Übereinstimmung an. Für die Interpretation von κ gelten folgende Richtwerte [Grouven et al. 2007, S. 66]:

Wert von κ	Stärke der Übereinstimmung
0,81 - 1,00	Sehr gut
0,61 - 0,80	Gut
0,41 - 0,60	Mittelmäßig
0,21 - 0,40	Leicht
$\leq 0,20$	Schwach

Tabelle 4: Interpretationswerte des Kappa-Koeffizienten

3. Ergebnisse

3.1. Graduelle Einteilung der Befunde

Für Studienzwecke wurden die zytologischen und histologischen Befunde graduell von 0 bis 5 eingeteilt. Die Einteilung entspricht der Münchner Nomenklatur II, der WHO-Nomenklatur/CIN sowie der Bethesda-Nomenklatur wie folgt:

Graduelle Einteilung	Dysplasie	Münchner Nomenklatur II	WHO-Nomenklatur	Bethesda-Nomenklatur
(0)	keine	I/II	-	-
(1)	leichte	IIID	CIN I	LSIL
(2)	mäßige	IIID	CIN II	HSIL
(3)	schwere	IVa/b	CIN III	HSIL
(4)	<i>Carcinoma in situ</i>	IVa/b	CIN III	HSIL
(5)	Karzinom	V	invasives Karzinom	invasives Karzinom

Tabelle 5: Gegenüberstellung der einzelnen Definitionen bei den zytologischen und histologischen Befunden

Diese graduelle Einteilung wird in den folgenden Abschnitten des Ergebnisteils verwendet.

3.2. p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung vs. Zytologie

Zunächst werden zur Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse die Rohdaten der Zytologie im Vergleich mit dem Ergebnis der CINtec[®] PLUS-Untersuchung dargestellt. Diese Rohdaten sind in der folgenden Tabelle 6 angegeben;

CINtec [®] PLUS	Zytologie						Summe
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
Positiv	0	19	54	72	68	8	221
Negativ	0	36	44	25	20	4	129
Summe	0	55	98	97	88	12	350

Tabelle 6: Rohdaten p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec[®] PLUS) gegenüber Zytologie

Die Tabelle 7 stellt die Resultate der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec[®] PLUS) im Vergleich zur Zytologie bzgl. CIN II+ in einer Vierfeldertafel dar, in der die Fälle mit leichten Dysplasien als negativ eingestuft wurden und die Fälle ab mittlerer Dysplasie hingegen als positiv.

CINtec® PLUS	Zytologie				Summe	
	Positiv [(2), (3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv	202	57,7	19	5,4	221	63,1
Negativ	93	26,6	36	10,3	129	36,9
Summe	295	84,3	55	15,7	350	100,0

Tabelle 7: Vierfeldertafel - CINtec® PLUS, Zytologie bzgl. CIN II+

Wie man der Kreuztabelle bzgl. CIN II+ entnehmen kann, kommt es in 238 von 350 Fällen zu einer Übereinstimmung zwischen dem CINtec® PLUS-Ergebnis und der Zytologie, d.h. die Konkordanzrate beträgt 68,0%. In diesem Fall liegt eine leichte Übereinstimmung vor, da $\kappa = 0,36$. Ferner folgt für die Sensitivität 68,5%, die Spezifität 65,5%, den positiven Prädiktionswert 91,4% sowie für den negativen Prädiktionswert 27,9%.

In der folgenden Tabelle 8 sind die Auswertungen dargestellt, bei denen die Fälle mit leichten und mit mäßigen Dysplasien, also die gesamte Gruppe IIID, als negativ angesehen wurden:

CINtec® PLUS	Zytologie				Summe	
	Positiv [(3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1), (2)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv	148	42,3	73	20,8	221	63,1
Negativ	49	14,0	80	22,9	129	36,9
Summe	197	56,3	153	42,7	350	100,0

Tabelle 8: Vierfeldertafel - CINtec® PLUS, Zytologie bzgl. CIN III+

Wie man der Kreuztabelle bzgl. CIN III+ entnehmen kann, wurden 228 (von 350) Fälle im Vergleich von CINtec® PLUS und Abstrichzytologie als konkordant beurteilt, d.h. die Konkordanzrate beträgt 65,1%. In diesem Fall liegt eine leichte Übereinstimmung vor, da $\kappa = 0,30$. Ferner ergeben sich für die Sensitivität 75,1%, für die Spezifität 52,3%, für den positiven Prädiktionswert 67,0% sowie für den negativen Prädiktionswert 62,0%.

3.3. p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung vs. Probeexzision

Zunächst werden hier zur Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse die Rohdaten der histologischen Beurteilung der Probeexzisionen im Vergleich mit dem CINtec® PLUS-Ergebnis an der vorherigen Abstrichzytologie präsentiert.

CINtec® PLUS	Probeexzision						Summe
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
Positiv	20	6	20	137	31	7	221
Negativ	18	22	23	53	8	5	129
Summe	38	28	43	190	39	12	350

Tabelle 9: Rohdaten p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec® PLUS) gegenüber Probeexzision

Die folgende Tabelle 10 stellt die Resultate der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec® PLUS) im Vergleich zur Probeexzision bzgl. CIN II+ in einer Vierfeldertafel dar. Dabei werden analog zu Tabelle 7 die Fälle bis einschließlich leichter Dysplasie (CIN I, LSIL) als negativ gewertet, diejenigen ab mittlerer Dysplasie als positiv.

CINtec® PLUS	Probeexzision				Summe	
	Positiv [(2), (3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv	195	55,8	26	7,4	221	63,1
Negativ	89	25,4	40	11,4	129	36,9
Summe	284	81,2	66	18,8	350	100,0

Tabelle 10: Vierfeldertafel - CINtec® PLUS, Probeexzision bzgl. CIN II+

Wie man der Kreuztabelle bzgl. CIN II+ entnehmen kann, kommt es in 235 von 350 Fällen zu einer Übereinstimmung zwischen dem CINtec® PLUS-Ergebnis und dem der Probeexzision, d.h. die Konkordanzrate beträgt 67,1%. In diesem Fall liegt eine leichte Übereinstimmung vor, da $\kappa = 0,34$. Ferner beträgt die Sensitivität 68,7%, die Spezifität 60,6%, der positive Prädiktionwert 88,2% und der negative Prädiktionwert 31,0%.

In der Tabelle 11 sind hierzu modifizierte Auswertungen wiedergegeben, bei denen die Fälle mit leichten sowie mit mäßigen Dysplasien, also die Fälle mit Diagnosen als CIN I bzw. als CIN II, als negativ und alle übrigen als positiv angesehen wurden.

CINtec® PLUS	Probeexzision				Summe	
	Positiv [(3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1), (2)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv	175	50,0	46	13,1	221	63,1
Negativ	66	18,9	63	18,0	129	36,9
Summe	241	68,9	109	31,1	350	100,0

Tabelle 11: Vierfeldertafel - CINtec® PLUS, Probeexzision bzgl. CIN III+

Die Kreuztabelle bzgl. CIN III+ zeigt, dass es in 238 von 350 Fällen zu einer Übereinstimmung zwischen dem CINtec® PLUS-Ergebnis und dem der Probeexzision gekommen ist, d.h. die Konkordanzrate beträgt 68,0%. In diesem Fall liegt eine leichte Übereinstimmung vor, da $\kappa = 0,36$. Als Sensitivität ergibt sich 72,6%, als Spezifität 57,8%, als positiver Prädiktionswert 79,2% sowie als negativer Prädiktionswert 48,8%.

3.4. p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung vs. Konisation

Zunächst werden die Ergebnisse die Rohdaten der histologischen Aufarbeitung der 184 durchgeführten Konisationen bezogen auf das Ergebnis der zytologischen Untersuchung mit CINtec® PLUS dargestellt.

CINtec® PLUS	Konisation						Summe
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
Positiv	10	1	4	82	29	4	130
Negativ	4	3	9	30	7	1	54
Summe	14	4	13	112	36	5	184

Tabelle 12: Rohdaten p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec® PLUS) gegenüber Konisation

Die Tabelle 13 stellt die Resultate der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec® PLUS) im Vergleich zur Konisation bzgl. CIN II+ in einer Vierfeldertafel dar. Die Konisationen ohne Dysplasie oder mit dem Bild einer CIN I werden als negativ und alle übrigen als positiv gewertet.

CINtec® PLUS	Konisation				Summe	
	Positiv [(2), (3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv	119	64,7	11	6,0	130	70,7
Negativ	47	25,5	7	3,8	54	29,3
Summe	166	90,2	18	9,8	184	100,0

Tabelle 13: Vierfeldertafel - CINtec® PLUS, Konisation bzgl. CIN II+

Wie man der Kreuztabelle bzgl. CIN II+ entnehmen kann, kommt es in 126 von 184 Fällen zu einer Übereinstimmung zwischen dem CINtec® PLUS-Ergebnis und dem der Konisation, d.h. die Konkordanz beträgt 68,5%. Es liegt eine leichte Übereinstimmung vor, da $\kappa = 0,37$. Die Sensitivität liegt bei 71,7%, die Spezifität bei 38,9%, der positive Prädiktionswert bei 91,5% und der negative Prädiktionswert bei 13,0%.

Die Tabelle 14 zeigt analog Auswertungen, bei denen die Fälle ohne Dysplasie sowie die Fälle mit leichten und mit mäßigen Dysplasien, also die Fälle mit Diagnosen als CIN I bzw. als CIN II, als negativ und alle übrigen als positiv angenommen wurden.

CINtec® PLUS	Konisation				Summe	
	Positiv [(3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1), (2)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv	115	62,5	15	8,2	130	70,7
Negativ	38	20,7	16	8,6	54	29,3
Summe	153	83,2	31	16,8	184	100,0

Tabelle 14: Vierfeldertafel - CINtec® PLUS, Konisation bzgl. CIN III+

Aus der Kreuztabelle bzgl. CIN III+ ergibt sich, dass in 131 von 184 Fällen eine Übereinstimmung zwischen dem CINtec® PLUS-Ergebnis und dem der Konisation vorliegt, d.h. die Konkordanzrate beträgt 71,2%. In diesem Fall liegt eine mittelmäßige Übereinstimmung vor, da $\kappa = 0,42$. Ferner beträgt die Sensitivität 75,2%, die Spezifität 51,6%, der positive Prädiktionwert 88,5% sowie der negative Prädiktionwert 29,6%.

3.5. Zusammenfassung der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbungsergebnisse

Als Überblick der Vergleichswerte des CINtec® PLUS-Verfahrens mit dem konventionellen Abstrich, der Probeexzision sowie der Konisation bzgl. der Identifizierung von CIN II+ bzw. CIN III+ folgt zusammenfassend:

	P ₀	κ	SEN	SPEZ	PPV	NPV
CINtec® PLUS vs. Zytologie bzgl. CIN II+	68,0%	0,36	68,5%	65,5%	91,4%	27,9%
CINtec® PLUS vs. Zytologie bzgl. CIN III+	65,1%	0,30	75,1%	52,3%	67,0%	62,0%
<hr/>						
CINtec® PLUS vs. Probeexzision bzgl. CIN II+	67,1%	0,34	68,7%	60,6%	88,2%	31,0%
CINtec® PLUS vs. Probeexzision bzgl. CIN III+	68,0%	0,36	72,6%	57,8%	79,2%	48,8%
<hr/>						
CINtec® PLUS vs. Konisation bzgl. CIN II+	68,5%	0,37	71,7%	38,9%	91,5%	13,0%
CINtec® PLUS vs. Konisation bzgl. CIN III+	71,2%	0,42	75,2%	51,6%	88,5%	29,6%

Tabelle 15: Übersicht der Vergleichswerte CINtec® PLUS, Zytologie, Probeexzision und Konisation

3.6. Korrelation der Befundung der zytologischen Abstriche, der Biopsien und der Konisationen

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Zytologie, der Probeexzisionen und der Konisationen miteinander korreliert. Um eine von der Doppelfärbung unabhängige Korrelationen zu ermitteln, werden dabei die Resultate des CINtec® PLUS-Verfahrens nicht berücksichtigt. Die Daten werden zum einen nach der Münchner Nomenklatur II, zum anderen nach dem Bethesda-System und abschließend, um die Vergleichbarkeit mit dem CINtec® PLUS-Verfahren zu ermöglichen, nach der graduellen Einteilung klassifiziert.

3.6.1. Zytologie vs. Probeexzision

Zunächst werden hier zur Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse die Rohdaten der Zytologie im Vergleich mit der Probeexzision präsentiert.

Zytologie	Probeexzision						Summe
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
(0)	-	-	-	-	-	-	-
(1)	13	21	6	12	2	1	55
(2)	6	4	29	53	6	0	98
(3)	14	1	3	67	12	0	97
(4)	5	1	5	55	18	4	88
(5)	0	1	0	3	1	7	12
Summe	38	28	43	190	39	12	350

Tabelle 16.: Rohdaten Zytologie gegenüber Probeexzision ohne p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec® PLUS)

3.6.1.1. Zytologie vs. Probeexzision nach der Münchner Nomenklatur II

Die Tabelle 17a stellt die Resultate des konventionellen Abstrichs im Vergleich zur Biopsie nach Definition der Münchner Nomenklatur II in einer 3x3-Kreuztafel dar. Dabei werden die graduellen Einteilungen (0), (1) und (2) zu einer Kategorie, die graduellen Einteilungen (3) und (4) zu einer weiteren sowie die graduelle Einteilung (5) zu einer eigenständigen dritten Kategorie eingruppiert.

Zytologie	Probeexzision						Summe	
	(0), (1), (2)		(3), (4)		(5)			
	#	%	#	%	#	%	#	%
(0),(1),(2)	79	22,6	73	20,9	1	0,3	153	43,7
(3), (4)	29	8,3	152	43,4	4	1,1	185	52,9
(5)	1	0,3	4	1,1	7	2,0	12	3,4
Summe	109	31,1	229	65,4	12	3,4	350	100,0

Tabelle 17a: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse des PAP-Abstrichs stimmen bezogen auf die Gruppeneinteilung mit den Diagnosen der Probeexzision zu 68,0% überein. Davon ist der Anteil der Fälle bei einem I/II- oder IIID-Befund mit 22,6%, bei einem IVa/b-Befund mit 43,4% sowie bei einem V-Befund mit 2,0% zu beziffern. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,38$ als leicht einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Um die statistischen Werte bzgl. der Sensitivität, der Spezifität, des positiven sowie des negativen Prädiktionwertes zu ermitteln, wird anschließend stets einer der Kategorien mit den zusammengefassten beiden anderen betrachtet, so dass man eine Vierfeldertafel erhält.

Zytologie	Probeexzision				Summe	
	[(0), (1), (2)]		[(3), (4), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(0), (1), (2)]	79	22,6	74	21,2	153	43,7
[(3), (4), (5)]	30	8,6	167	47,7	197	56,3
Summe	109	31,1	241	68,9	350	100,0

Tabelle 17b: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse des I/II- oder IIID-Befundes der Zytologie stimmen mit der zugehörigen Einteilung der Probeexzision zu 70,3% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,41$ als mittelmäßig einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ferner beträgt die Sensitivität 72,5%, die Spezifität 69,3%, der positive Prädiktionswert 51,6% sowie der negative Prädiktionswert 84,8%.

Zytologie	Probeexzision				Summe	
	[(3), (4)]		[(0), (1), (2), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(3), (4)]	152	43,4	33	9,4	185	52,9
[(0), (1), (2), (5)]	77	22,0	88	25,1	165	47,1
Summe	229	65,4	121	34,6	350	100,0

Tabelle 17c: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse des IVa/b-Befundes der Zytologie stimmen mit der zugehörigen Einteilung der Biopsie zu 68,6% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,37$ als leicht einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ferner beträgt die Sensitivität 66,4%, die Spezifität 72,7%, der positive Prädiktionswert 82,2% sowie der negative Prädiktionswert 53,3%.

Zytologie	Probeexzision				Summe	
	[(5)]		[(0), (1), (2), (3), (4)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(5)]	7	2,0	5	1,4	12	3,4
[(0), (1), (2), (3), (4)]	5	1,4	333	95,1	338	96,6
Summe	12	3,4	338	96,6	350	100,0

Tabelle 17d: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse des V-Befundes der Zytologie stimmen mit der zugehörigen Einteilung der Biopsie zu 97,1% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,94$ als sehr gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ferner beträgt die Sensitivität 58,3%, die Spezifität 98,5%, der positive Prädiktionswert 58,3% sowie der negative Prädiktionswert 98,5%.

3.6.1.2. Zytologie vs. Probeexzision nach dem Bethesda-System

Die Tabelle 18a stellt die Resultate des konventionellen Abstrichs im Vergleich zur Biopsie nach Definition des Bethesda-Systems in einer 3x3-Kreuztafel dar. Dabei werden diesmal die graduellen Einteilungen (0) und (1) zu einer Kategorie, die graduellen Einteilungen (2), (3) und (4) zu einer weiteren sowie die graduelle Einteilung (5) zu einer eigenständigen dritten Kategorie eingruppiert.

Zytologie	Probeexzision						Summe	
	(0), (1)		(2), (3), (4)		(5)			
	#	%	#	%	#	%	#	%
(0), (1)	34	9,7	20	5,7	1	0,3	55	15,7
(2), (3), (4)	31	8,9	248	70,9	4	1,1	283	80,9
(5)	1	0,3	4	1,1	7	2,0	12	3,4
Summe	66	18,9	272	77,7	12	3,4	350	100,0

Tabelle 18a: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach dem Bethesda-System

Die Ergebnisse des PAP-Abstrichs stimmen mit der Probeexzision zu 82,6% überein. Davon ist die Übereinstimmung bei einem LSIL-Befund mit 9,7%, bei einem HSIL-Befund mit 70,9% sowie bei einem invasiven Karzinom mit 2,0% zu beziffern. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,49$ als mittelmäßig einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Um auch hier die statistischen Werte bzgl. der Sensitivität, der Spezifität, des positiven sowie des negativen Prädiktionwertes zu ermitteln, wird anschließend stets einer der Kategorien mit den zusammengefassten beiden anderen betrachtet, so dass man eine Vierfeldertafel erhält.

Zytologie	Probeexzision				Summe	
	[(0), (1)]		[(2), (3), (4), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(0), (1)]	34	9,7	21	6,0	55	15,7
[(2), (3), (4), (5)]	32	9,1	263	75,1	295	84,3
Summe	66	31,1	284	81,1	350	100,0

Tabelle 18b: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach dem Bethesda-System

Die Ergebnisse des LSIL-Befundes der Zytologie stimmen mit der zugehörigen Einteilung der Biopsie zu 84,9% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,70$ als gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ferner beträgt die Sensitivität 51,5%, die Spezifität 92,6%, der positive Prädiktionswert 61,8% sowie der negative Prädiktionswert 89,2%.

Zytologie	Probeexzision				Summe	
	[(2), (3), (4)]		[(0), (1), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(2), (3), (4)]	248	70,9	35	10,0	185	80,9
[(0), (1), (5)]	24	6,9	43	12,3	165	19,1
Summe	272	77,7	78	22,3	350	100,0

Tabelle 18c: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach dem Bethesda-System

Die Ergebnisse des HSIL-Befundes der Zytologie stimmen mit der zugehörigen Einteilung der Biopsie zu 83,1% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,66$ als gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ferner beträgt die Sensitivität 91,2%, die Spezifität 55,1%, der positive Prädiktionswert 87,6% sowie der negative Prädiktionswert 64,2%.

3.6.1.3. Zytologie vs. Probeexzision nach der graduellen Einteilung

Zunächst wird auf die Ergebnisse bezüglich der Identifizierung einer CIN II+ und anschließend zur Identifizierung einer CIN III+ eingegangen.

3.6.1.3.1. Identifizierung einer CIN II+ Läsion

Die folgende Tabelle 19 stellt die Resultate des konventionellen zytologischen Abstrichs im Vergleich zur Biopsie in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung einer CIN II+ Läsion dar:

Zytologie	Probeexzision				Summe	
	Positiv [(2), (3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(2), (3), (4), (5)]	263	75,1	32	9,1	295	84,3
Negativ [(0), (1)]	21	6,0	34	9,7	55	15,7
Summe	284	81,1	66	18,9	350	100,0

Tabelle 19: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+

Die Ergebnisse des PAP-Abstrichs stimmen mit der Biopsie zu 84,9% überein. Die Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,70$ als gut einzustufen.

Bezieht man die Datenverteilung auf die Ergebnisse der Probeexzision, indem man diese als repräsentativ ansieht, so ergeben sich für die Zytologie Werte für die Sensitivität von 92,6%, für die Spezifität von 51,5%, für den positiven Prädiktionswert von 89,2% sowie für den negativen Prädiktionswert von 61,8%.

Setzt man hingegen das Ergebnis der Zytologie als richtig voraus, so wären, bezogen auf den diagnostischen Wert der Probeexzision, für die Sensitivität 89,2%, für die Spezifität

61,8%, für den positiven Prädiktionwert 92,6% und für den negativen Prädiktionwert 51,5% anzugeben.

3.6.1.3.2. Identifizierung einer CIN III+ Läsion

Die Tabelle 20 gibt die Resultate der konventionellen Abstrichzytologie im Vergleich zur histologischen Diagnostik an einer Biopsie in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+ wieder.

Zytologie	Probeexzision				Summe	
	Positiv [(3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1), (2)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(3), (4), (5)]	167	47,7	30	8,6	197	56,3
Negativ [(0), (1), (2)]	74	21,1	79	22,6	153	43,7
Summe	241	68,9	109	31,1	350	100,0

Tabelle 20: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+

Die Ergebnisse des PAP-Abstrichs stimmen mit der Biopsie zu 70,3% überein. Diese Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,41$ als mittelmäßig einzustufen.

Geht man von den Ergebnissen der Probeexzision als richtig aus, so liegen für die Zytologie die Werte für die Sensitivität bei 69,3%, für die Spezifität bei 72,5%, für den positiven Prädiktionwert bei 84,8% und für den negativen Prädiktionwert bei 51,6%.

Bei Bezugnahme auf das Ergebnis der Zytologie als richtig, ergäbe sich für die Diagnostik anhand der Probeexzision eine Sensitivität von 84,8%, eine Spezifität von 51,6%, ein positiver Prädiktionswert von 69,3% und ein negativer Prädiktionswert von 72,5%.

3.6.2. Zytologie vs. Konisation

Zunächst werden in Tabelle 21 zur Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse die Rohdaten der Zytologie im Vergleich mit der Konisation (184 Fälle) dargestellt.

Zytologie	Konisation						Summe
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
(0)	-	-	-	-	-	-	-
(1)	4	3	1	4	0	1	13
(2)	3	1	7	25	3	0	39
(3)	6	0	3	46	15	0	70
(4)	1	0	2	36	16	3	58
(5)	0	0	0	1	2	1	4
Summe	14	4	13	112	36	5	184

Tabelle 21: Rohdaten Zytologie gegenüber Konisation ohne p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec® PLUS)

3.6.2.1. Zytologie vs. Konisation nach der Münchner Nomenklatur II

Die Tabelle 22a stellt die Resultate des konventionellen Abstrichs im Vergleich zur histologischen Diagnostik an einem Konus nach Definition der Münchner Nomenklatur II in einer 3x3-Kreuztafel dar. Dabei werden die graduellen Einteilungen (0), (1) und (2) zu einer Kategorie, die graduellen Einteilungen (3) und (4) zu einer weiteren sowie die graduelle Einteilung (5) zu einer eigenständigen dritten Kategorie eingruppiert.

Zytologie	Konisation						Summe	
	(0), (1), (2)		(3), (4)		(5)			
	#	%	#	%	#	%	#	%
(0),(1),(2)	19	10,3	32	17,4	1	0,5	52	28,3
(3), (4)	12	6,5	113	61,4	3	1,6	128	69,6
(5)	0	0,0	3	1,6	1	0,5	4	2,2
Summe	31	16,8	148	80,4	5	2,7	184	100,0

Tabelle 22a: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse des PAP-Abstrichs stimmen bezogen auf die Gruppeneinteilung mit den Diagnosen des Konus zu 72,3% überein. Davon ist der Anteil der Fälle bei einem I/II- oder IIID-Befund mit 10,3%, bei einem IVa/b-Befund mit 61,4% sowie bei einem V-Befund mit 0,5% zu beziffern. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,29$ als leicht einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Um die statistischen Werte bzgl. der Sensitivität, der Spezifität, des positiven sowie des negativen Prädiktionwertes zu ermitteln, wird anschließend stets einer der Kategorien mit den zusammengefassten beiden anderen betrachtet, so dass man eine Vierfeldertafel erhält.

Zytologie	Konisation				Summe	
	[(0), (1), (2)]		[(3), (4), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(0), (1), (2)]	19	10,3	33	17,9	52	28,3
[(3), (4), (5)]	12	6,5	120	65,2	132	71,7
Summe	31	16,8	153	83,2	184	100,0

Tabelle 22b: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse des I/II- oder IIID-Befundes der Zytologie stimmen mit der zugehörigen Einteilung der Konisation zu 75,5% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,51$ als mittelmäßig einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die Sensitivität beträgt 61,3%, die Spezifität 78,4%, der positive Prädiktionswert 36,5% sowie der negative Prädiktionswert 90,9%.

Zytologie	Konisation				Summe	
	[(3), (4)]		[(0), (1), (2), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(3), (4)]	113	61,4	15	8,2	128	69,6
[(0), (1), (2), (5)]	35	19,0	21	11,4	56	30,4
Summe	148	80,4	36	19,6	184	100,0

Tabelle 22c: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse des IVa/b-Befundes der Zytologie stimmen mit der zugehörigen Einteilung der Konisation zu 72,8% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,46$ als mittelmäßig einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ferner beträgt die Sensitivität 76,4%, die Spezifität 58,3%, der positive Prädiktionswert 88,3% sowie der negative Prädiktionswert 37,5%.

Zytologie	Konisation				Summe	
	[(5)]		[(0), (1), (2), (3), (4)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(5)]	1	0,5	3	1,6	4	2,2
[(0), (1), (2), (3), (4)]	4	2,2	176	95,7	180	97,8
Summe	5	2,7	179	97,3	184	100,0

Tabelle 22d: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse des V-Befundes der Zytologie stimmen mit der zugehörigen Einteilung der Konisation zu 96,2% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,92$ als sehr gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die Werte für die Sensitivität liegen bei 20,0%, für die Spezifität bei 98,3%, für den positiven Prädiktionswert bei 25,0% sowie für den negativen Prädiktionswert bei 97,8%.

3.6.2.2. Zytologie vs. Konisation nach dem Bethesda-System

Die folgende Tabelle 23a stellt die Resultate des konventionellen Abstrichs im Vergleich zum Konus in einer 3x3-Kreuztafel nach dem Bethesda-System dar. Dabei werden die graduellen Einteilungen (0) und (1) zu einer Kategorie, die graduellen Einteilungen (2), (3) und (4) zu einer weiteren sowie die graduelle Einteilung (5) zu einer eigenständigen dritten Kategorie eingruppiert.

Zytologie	Konisation						Summe	
	(0), (1)		(2), (3), (4)		(5)			
	#	%	#	%	#	%	#	%
(0), (1)	7	3,8	5	2,7	1	0,5	13	7,1
(2), (3), (4)	11	6,0	153	83,2	3	1,6	167	90,8
(5)	0	0,0	3	1,6	1	0,5	4	2,2
Summe	18	9,8	161	87,5	5	2,7	184	100,0

Tabelle 23a: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach dem Bethesda-System

Die Ergebnisse des PAP-Abstrichs stimmen mit der Konisation zu 87,5% überein. Davon ist die Übereinstimmung bei einem LSIL-Befund mit 3,8%, bei einem HSIL-Befund mit 83,2% sowie bei einem invasiven Karzinom mit 0,5% zu beziffern. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,37$ als leicht einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Um die statistischen Werte bzgl. der Sensitivität, der Spezifität, des positiven sowie des negativen Prädiktionwertes zu ermitteln, wird anschließend stets einer der Kategorien mit den zusammengefassten beiden anderen betrachtet, so dass man eine Vierfeldertafel erhält.

Zytologie	Konisation				Summe	
	[(0), (1)]		[(2), (3), (4), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(0), (1)]	7	3,8	6	3,3	13	7,1
[(2), (3), (4), (5)]	11	6,0	160	87,0	171	92,9
Summe	18	9,8	166	90,2	184	100,0

Tabelle 23b: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach dem Bethesda-System

Die Ergebnisse des LSIL-Befundes der Zytologie stimmen mit der zugehörigen Einteilung der Konisation zu 90,8% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,82$ als sehr gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Es ergeben sich Werte für die Sensitivität von 38,9%, für die Spezifität von 96,4%, für den positiven Prädiktionwert von 53,8% und für den negativen Prädiktionwert von 93,6%.

Zytologie	Konisation				Summe	
	[(2), (3), (4)]		[(0), (1), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(2), (3), (4)]	153	83,2	14	7,6	167	90,8
[(0), (1), (5)]	8	4,3	9	4,9	17	9,2
Summe	161	87,5	23	12,5	184	100,0

Tabelle 23c: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach dem Bethesda-System

Die Ergebnisse des HSIL-Befundes der Zytologie stimmen mit der zugehörigen Einteilung der Konisation zu 88,0% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,76$ als gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ferner beträgt die Sensitivität 95,0%, die Spezifität 39,1%, der positive Prädiktionswert 91,6% sowie der negative Prädiktionswert 52,9%.

3.6.2.3. Zytologie vs. Konisation nach der graduellen Einteilung

Zunächst werden die Ergebnisse zur Identifizierung einer CIN II+ und anschließend zur Identifizierung einer CIN III+ dargestellt.

3.6.2.3.1. Nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+

Die folgende Tabelle 24 stellt die Resultate des konventionellen Abstrichs denjenigen der Konisation in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung einer CIN II+ gegenüber:

Zytologie	Konisation				Summe	
	Positiv [(2), (3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(2), (3), (4), (5)]	160	87,0	11	6,0	171	92,9
Negativ [(0), (1)]	6	3,3	7	3,8	13	7,1
Summe	166	90,2	18	9,8	184	100,0

Tabelle 24: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+

Die Ergebnisse des PAP-Abstrichs stimmen mit der Konisation zu 90,8% überein. Diese Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,82$ als sehr gut einzustufen.

Bezieht man die Datenverteilung auf die Ergebnisse der Konisation, so liegen für die Zytologie die Werte für die Sensitivität bei 96,4%, für die Spezifität bei 38,9%, für den positiven Prädiktionwert bei 93,6% sowie für den negativen Prädiktionwert bei 53,8%.

Geht man hingegen vom Ergebnis der Zytologie als richtig aus, so wären bezogen auf den diagnostischen Wert der Konisation für die Sensitivität 93,6%, für die Spezifität 53,8%, für den positiven Prädiktionwert 96,4% und für den negativen Prädiktionwert 38,9% anzugeben.

3.6.2.3.2. Nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+

Die Tab. 25 zeigt die Resultate des konventionellen Abstrichs im Vergleich zur Konisation in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+.

Zytologie	Konisation				Summe	
	Positiv [(3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1), (2)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(3), (4), (5)]	120	65,2	12	6,5	132	71,7
Negativ [(0), (1), (2)]	33	17,9	19	10,3	52	28,3
Summe	153	83,2	31	16,8	184	100,0

Tabelle 25: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+

Die Ergebnisse des PAP-Abstrichs stimmen mit der Konisation zu 75,5% überein. Diese Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,51$ als mittelmäßig einzustufen.

Ausgehend von den Ergebnissen der Konisation liegen für die Zytologie die Werte für die Sensitivität bei 78,4%, für die Spezifität bei 61,3%, für den positiven Prädiktionswert bei 90,9% und für den negativen Prädiktionswert bei 36,5%.

Bei Bezugnahme auf das Ergebnis der Zytologie als richtig, ergäbe sich für die Diagnostik anhand der Konisation eine Sensitivität von 90,9%, eine Spezifität von 36,5%, ein positiver Prädiktionswert von 78,4% und ein negativer Prädiktionswert von 61,3%.

3.6.3. Probeexzision vs. Konisation

Zunächst werden hier zur Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse die Rohdaten der Probeexzision im Vergleich mit der Konisation (184 Fälle) präsentiert.

Probeexzision	Konisation						Summe
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
(0)	5	0	0	9	0	0	14
(1)	1	2	1	1	0	0	5
(2)	2	0	6	6	3	0	17
(3)	6	2	5	84	19	2	118
(4)	0	0	1	12	14	1	28
(5)	0	0	0	0	0	2	2
Summe	14	4	13	112	36	5	184

Tabelle 26: Rohdaten Probeexzision gegenüber Konisation ohne p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec[®] PLUS)

3.6.3.1. Probeexzision vs. Konisation analog zur Münchner Nomenklatur II

Die folgende Tabelle 27a stellt die Resultate der Biopsie im Vergleich zum Konus in einer 3x3-Kreuztafel analog zur Münchner Nomenklatur II dar, d.h. unter Zuordnung von Fällen mit keiner, leichter bzw. mäßiger Dysplasie in einer gemeinsamen Gruppe:

Probe- exzision	Konisation						Summe	
	(0), (1), (2)		(3), (4)		(5)			
	#	%	#	%	#	%	#	%
(0),(1),(2)	17	9,2	19	10,3	0	0,0	36	19,6
(3), (4)	14	7,6	129	70,1	3	1,6	146	79,3
(5)	0	0,0	0	0,0	2	1,1	2	1,1
Summe	31	16,8	148	80,4	5	2,7	184	100,0

Tabelle 27a: Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse der Probeexzision stimmen mit der Konisation zu 80,4% überein. Davon stellen die Befunde mit keiner, leichter oder mäßiger Dysplasie 9,2%, die Befunde mit schwerer Dysplasie oder *Carcinoma in situ* 70,1% sowie die Befunde bei einem invasiven Karzinom 1,1%. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,40$ als leicht einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Um die statistischen Werte bzgl. der Sensitivität, der Spezifität, des positiven sowie des negativen Prädiktionwertes zu ermitteln, wird anschließend stets einer der Kategorien mit den zusammengefassten beiden anderen betrachtet, so dass man eine Vierfeldertafel erhält.

Probeexzision	Konisation				Summe	
	[(0), (1), (2)]		[(3), (4), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(0), (1), (2)]	17	9,2	19	10,3	36	19,6
[(3), (4), (5)]	14	7,6	134	72,8	148	80,4
Summe	31	16,8	153	83,2	184	100,0

Tabelle 27b: Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse mit den Befunden bei keiner, leichter oder mäßiger Dysplasie der Probeexzision stimmen mit der Konisation zu 82,1% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,64$ als gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ferner beträgt die Sensitivität 54,8%, die Spezifität 87,6%, der positive Prädiktionswert 47,2% sowie der negative Prädiktionswert 90,5%.

Probeexzision	Konisation				Summe	
	[(3), (4)]		[(0), (1), (2), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(3), (4)]	129	70,1	17	9,2	146	79,3
[(0), (1), (2), (5)]	19	10,3	19	10,3	38	20,7
Summe	148	80,4	36	19,6	184	100,0

Tabelle 27c: Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse mit den Befunden der schweren Dysplasie oder *Carcinoma in situ* der Probeexzision stimmen mit der Konisation zu 80,4% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,61$ als gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die Werte für die Sensitivität betragen 87,2%, für die Spezifität 52,8%, für den positiven Prädiktionswert 88,4% und für den negativen Prädiktionswert 50,0%.

Probeexzision	Konisation				Summe	
	[(5)]		[(1), (2), (3), (4)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(5)]	2	1,1	0	0,0	2	1,1
[(1), (2), (3), (4)]	3	1,6	179	97,3	182	98,9
Summe	5	2,7	179	97,3	184	100,0

Tabelle 27d: Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach der Münchner Nomenklatur II

Die Ergebnisse mit dem Befund des invasiven Karzinoms der Probeexzision stimmen mit der Konisation zu 98,4% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,97$ als sehr gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ferner beträgt die Sensitivität 40,0%, die Spezifität 100,0%, der positive Prädiktionswert 100,0% sowie der negative Prädiktionswert 98,4%.

3.6.3.2. Probeexzision vs. Konisation nach dem Bethesda-System

Die folgende Tabelle 28a stellt die Resultate der Biopsie im Vergleich zum Konus in einer 3x3-Kreuztafel nach dem Bethesda-System dar. Dabei werden diesmal die graduellen Einteilungen (0) und (1) zu einer Kategorie, die graduellen Einteilungen (2), (3) und (4) zu einer weiteren sowie die graduelle Einteilung (5) zu einer eigenständigen dritten Kategorie eingruppiert.

Probe- exzision	Konisation						Summe	
	(0), (1)		(2), (3), (4)		(5)			
	#	%	#	%	#	%	#	%
(0), (1)	8	4,3	11	6,0	0	0,0	19	10,3
(2), (3), (4)	10	5,4	150	81,5	3	1,6	163	88,6
(5)	0	0,0	0	0,0	2	1,1	2	1,1
Summe	18	9,8	161	87,5	5	2,7	184	100,0

Tabelle 28a: Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach dem Bethesda-System

Die Ergebnisse der Probeexzision stimmen mit der Konisation zu 87,0% überein. Davon stellen die LSIL-Befunde 4,3%, die HSIL-Befunde 81,5% sowie die invasiven Karzinome 1,1% dar. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,39$ als leicht einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Um die statistischen Werte bzgl. der Sensitivität, der Spezifität, des positiven sowie des negativen Prädiktionwertes zu ermitteln, wird anschließend stets einer der Kategorien mit den zusammengefassten beiden anderen betrachtet, so dass man eine Vierfeldertafel erhält.

Probeexzision	Konisation				Summe	
	[(0), (1)]		[(2), (3), (4), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(0), (1)]	8	4,3	11	6,0	19	10,3
[(2), (3), (4), (5)]	10	5,4	155	84,2	165	89,7
Summe	18	9,8	166	90,2	184	100,0

Tabelle 28b: Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach dem Bethesda-System

Die Ergebnisse des LSIL-Befundes der Probeexzision stimmen mit der Konisation zu 88,6% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,77$ als gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die diagnostischen Werte liegen für die Sensitivität bei 44,4%, für die Spezifität bei 93,4%, für den positiven Prädiktionwert bei 42,1% sowie für den negativen Prädiktionwert bei 93,9%.

Probeexzision	Konisation				Summe	
	[(2), (3), (4)]		[(0), (1), (5)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
[(2), (3), (4)]	150	81,5	13	7,1	163	88,6
[(0), (1), (5)]	11	6,0	10	5,4	21	11,4
Summe	161	87,5	23	12,5	184	100,0

Tabelle 28c: Kreuztafel Probeexzision, Konisation nach dem Bethesda-System

Die Ergebnisse des HSIL-Befundes der Probeexzision stimmen mit der Konisation zu 87,0% überein. Die vorliegende Konkordanz ist mit $\kappa = 0,74$ als gut einzustufen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die Werte betragen für die Sensitivität 93,2%, für die Spezifität 43,5%, für den positiven Prädiktionwert 92,0% und für den negativen Prädiktionwert 47,6%.

3.6.3.3. Konisation vs. Probeexzision nach der graduellen Einteilung

Zunächst werden auf die Ergebnisse nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+ und anschließend zur Identifizierung von CIN III+ eingegangen.

3.6.3.3.1. Nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+

Die Tabelle 29 stellt die Resultate der Konisation im Vergleich zur Probeexzision in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+ dar.

Konisation	Probeexzision				Summe	
	Positiv [(2), (3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(2), (3), (4), (5)]	155	84,2	11	6,0	166	90,2
Negativ [(0), (1)]	10	5,4	8	4,3	18	9,8
Summe	166	89,7	18	10,3	184	100,0

Tabelle 29: Kreuztafel Konisation, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+

Die Ergebnisse der Konisation stimmen mit der Probeexzision zu 88,6% überein. Diese Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,77$ als gut einzustufen.

Ausgehend von den Ergebnissen der Biopsie ergeben sich für die Konisation Werte für die Sensitivität von 93,9%, für die Spezifität von 42,1%, für den positiven Prädiktionswert von 93,4% und für den negativen Prädiktionswert von 44,4%. Eine Angabe von Werten in die „andere Richtung“, also für die Biopsie auf dem Boden der Konisation, erscheint nicht sinnvoll, da diese zeitliche Abfolge von Untersuchungen in der Realität fast nie vorkommen wird.

3.6.3.3.2. Nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+

In Tabelle 30 sind die Resultate der Probeexzision im Vergleich zur Konisation in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+ dargestellt.

Konisation	Probeexzision				Summe	
	Positiv [(3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1), (2)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(3), (4), (5)]	134	72,8	14	7,6	148	80,4
Negativ [(0), (1), (2)]	19	10,3	17	9,2	36	19,6
Summe	148	83,2	31	16,8	184	100,0

Tabelle 30: Kreuztafel Konisation, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+

Erneut ausgehend von den Ergebnissen der Biopsie liegen für die Konisation die Werte für die Sensitivität bei 87,6%, für die Spezifität bei 54,8%, für den positiven Prädiktionswert bei 90,5% und für den negativen Prädiktionswert bei 47,2%. Auf eine Angabe von Werten in die „andere Richtung“, also für die Biopsie auf dem Boden der Konisation, wird auch hier verzichtet.

3.6.4. Zusammenfassung der Vergleiche zu Zytologie, Probeexzision und Konisation

Die Ergebnisse der Abschnitte 3.6.1. bis 3.6.3 sind in Tabelle 31 zusammengefasst.

	P₀	κ	SEN	SPEZ	PPV	NPV
Zytologie vs. Probeexzision bzgl. CIN II+	84,9%	0,70	92,6%	51,5%	89,2%	61,8%
Zytologie vs. Probeexzision bzgl. CIN III+	70,3%	0,41	69,3%	72,5%	84,8%	51,6%
Zytologie vs. Konisation bzgl. CIN II+	90,8%	0,82	96,4%	38,9%	93,6%	53,8%
Zytologie vs. Konisation bzgl. CIN III+	75,5%	0,51	78,4%	61,3%	90,9%	36,5%
Konisation vs. Probeexzision bzgl. CIN II+	88,6%	0,77	93,9%	42,1%	93,4%	44,4%
Konisation vs. Probeexzision bzgl. CIN III+	82,1%	0,64	87,6%	54,8%	90,5%	47,2%

Tabelle 31: Übersicht der Vergleichswerte Zytologie, Probeexzision sowie Konisation untereinander

3.7. Vergleich Zytologie und Histologie

Im Folgenden wird die Zytologie mit der Gesamthistologie verglichen. Dabei werden zum einen sämtliche histologisch abgeklärten Fälle ($n = 350$) sowie zum anderen nur die Fälle, bei denen sowohl eine Probeexzision, als auch eine Konisation durchgeführt wurde ($n = 184$), berücksichtigt.

3.7.1. Zytologie vs. Histologie - 350 Fälle

Zunächst werden die Ergebnisse von Zytologie und Histologie nach der graduellen Einteilung wiedergegeben. Falls nur eine Probeexzision durchgeführt wurde, wird deren Ergebnis verwendet. Falls später auch noch eine Konisation vorgenommen wurde, folgt die Darstellung bei diskrepantem Ergebnis dem höheren Wert, also dem gravierenderen der beiden histologischen Befunde. Damit ergibt sich diese Rohtabelle als:

Zytologie	Histologie						Summe
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
(0)	-	-	-	-	-	-	-
(1)	11	20	7	13	2	2	55
(2)	6	4	24	56	8	0	98
(3)	8	0	2	66	21	0	97
(4)	4	1	2	49	26	6	88
(5)	0	1	0	1	3	7	12
Summe	29	26	35	185	60	15	350

Tabelle 32: Rohdaten Zytologie gegenüber Histologie

Die Konkordanz über alle sechs Kategorien beträgt 40,9% (143 von 350). Lässt man die 29 Fälle, bei denen sich histologisch keine Veränderungen nachweisen ließen, außer Acht, so beträgt sie 44,5% (143 von 329). Akzeptiert man in beide Richtungen Abweichungen um jeweils eine Kategorie, so umfasst die Übereinstimmung 302 Fälle, was einer Konkordanz von 86,3% (302 von 350) bzw. 91,8% (302 von 329) entspricht. Fasst man die Kategorien 3 und 4 (schwere Dysplasie und *Carcinoma in situ*), die inhaltlich heute als Synonyme gesehen werden, zusammen, so liegt die Übereinstimmung bei 213 Fällen mit Konkordanzwerten von 60,9% (213 von 350) bzw. 66,4% (213 von 321).

3.7.1.1. Zytologie vs. Histologie nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+

Die im Folgenden dargestellte Tabelle 33 zeigt die Resultate der Zytologie im Vergleich zur Histologie in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+:

Zytologie	Histologie				Summe	
	Positiv [(2), (3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(2), (3), (4), (5)]	271	77,4	24	6,9	295	84,3
Negativ [(0), (1)]	24	6,9	31	8,9	55	15,7
Summe	295	84,3	55	15,7	350	100,0

Tabelle 33: Kreuztafel Zytologie, Histologie nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+

Die Ergebnisse der Zytologie stimmen mit der Histologie zu 86,3% überein. Die Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,73$ als gut einzustufen. Ferner folgt für die Sensitivität 91,9%, die Spezifität 56,4%, den positiven Prädiktionswert 91,9% sowie für den negativen Prädiktionswert 56,4%. Da die Häufigkeit für ein positives Zytologieergebnis, wenn ein negatives Histologieergebnis vorliegt, der Häufigkeit für ein negatives Zytologieergebnis, wenn ein positives Histologieergebnis vorliegt, (zufällig) gleich, ist die Sensitivität identisch zum positiven Prädiktionswert und die Spezifität identisch zum negativen Prädiktionswert.

3.7.1.2. Zytologie vs. Histologie nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+

Die Tabelle 34 stellt die Resultate der Zytologie im Vergleich zur Histologie in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+ dar.

Zytologie	Histologie				Summe	
	Positiv [(3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1), (2)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(3), (4), (5)]	179	51,1	18	5,1	197	56,3
Negativ [(0), (1), (2)]	81	23,1	72	20,6	153	43,7
Summe	260	74,3	90	25,7	350	100,0

Tabelle 34: Kreuztafel Zytologie, Histologie nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+

Die Ergebnisse der Zytologie stimmen mit denen der Histologie zu 71,7% überein. Diese Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,43$ als mittelmäßig einzustufen. Ferner ergeben sich für die Sensitivität 68,8%, die Spezifität 80,0%, den positiven Prädiktionwert 90,9% sowie für den negativen Prädiktionwert 47,1%.

3.7.2. Zytologie vs. Histologie - 184 Fälle

Im Folgenden werden ausschließlich die Fälle berücksichtigt, für die sowohl histologische Untersuchungsergebnisse einer Probeexzision, als auch einer Konisation vorliegen. Dabei lieferte die Probeexzision in 29 Fällen und die Konisation in 42 Fällen die höhere graduelle Einteilung. In 113 Fällen waren sie identisch.

Zytologie	Histologie						Summe
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
(0)	-	-	-	-	-	-	-
(1)	1	3	3	5	0	1	13
(2)	0	0	6	28	5	0	39
(3)	4	0	0	48	18	0	70
(4)	0	0	0	31	24	3	58
(5)	0	0	0	1	2	1	4
Summe	5	3	9	113	49	5	184

Tabelle 35: Rohdaten Zytologie gegenüber Histologie (184 Fälle)

Die Konkordanz über alle sechs Kategorien beträgt 44,6% (82 von 184). Lässt man die fünf Fälle, bei denen sich histologisch keine Veränderungen nachweisen ließen, außer Acht, so beträgt sie 45,8% (82 von 179). Unter Einschluss auch von Abweichungen in beide Richtungen um jeweils eine Kategorie berechnet sich eine Übereinstimmung für 167 Fälle, was einer Konkordanz von 90,8% (= 167/184) bzw. 93,3% (= 167/179) entspricht. Fasst man die Kategorien 3 und 4 (schwere Dysplasie und *Carcinoma in situ*) bei inhaltlicher Synonymität zusammen, so ergibt sich eine Übereinstimmung für 131 Fälle mit Konkordanzwerten von 71,2% (131 von 184) bzw. 73,2% (131 von 179).

3.7.2.1. Zytologie vs. Histologie zur Identifizierung von CIN II+

Die folgende Tabelle 36 stellt die Resultate der Zytologie im Vergleich zur Histologie in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+ dar:

Zytologie	Histologie				Summe	
	Positiv [(2), (3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(2), (3), (4), (5)]	167	90,8	4	2,2	171	92,9
Negativ [(0), (1)]	9	4,9	4	2,2	13	7,1
Summe	176	95,7	8	4,3	184	100,0

Tabelle 36: Kreuztafel Zytologie, Histologie nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+ (184 Fälle)

Die Ergebnisse der Zytologie stimmen mit denen der Histologie zu 92,9% überein. Die Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,86$ als sehr gut einzustufen. Ferner folgt für die Sensitivität 94,9%, die Spezifität 50,0%, den positiven Prädiktionwert 97,9% sowie für den negativen Prädiktionwert 30,8%.

3.7.2.2. Zytologie vs. Histologie zur Identifizierung von CIN III+

In der Tabelle 37 sind die Ergebnisse der Zytologie im Vergleich zur Histologie nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+ wiedergegeben.

Zytologie	Histologie				Summe	
	Positiv [(3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1), (2)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(3), (4), (5)]	128	69,6	4	2,2	132	71,7
Negativ [(0), (1), (2)]	39	21,2	13	7,1	52	28,3
Summe	167	90,8	17	9,2	184	100,0

Tabelle 37: Kreuztafel Zytologie, Histologie nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+

Die Ergebnisse der Zytologie stimmen mit der Histologie zu 76,6% überein. Diese Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,53$ als mittelmäßig einzustufen. Ferner ergeben sich als Werte für die Sensitivität 76,6%, die Spezifität 76,5%, den positiven Prädiktionswert 97,0% sowie für den negativen Prädiktionswert 25,0%.

3.7.3. Zytologie vs. Probeexzision - 184 Fälle

Im Gegensatz zur Tabelle 32 werden nun die Rohdaten der Zytologie ausschließlich versus der Probeexzision, also nicht der Gesamthistologie, dargestellt.

Zytologie	Histologie (Probeexzision)						Summe
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
(0)	-	-	-	-	-	-	-
(1)	4	3	2	4	0	0	13
(2)	0	0	11	25	3	0	39
(3)	10	1	1	49	9	0	70
(4)	1	0	3	37	16	1	58
(5)	0	0	0	3	0	1	4
Summe	15	4	17	118	28	2	184

Tabelle 38: Rohdaten Zytologie gegenüber Histologie (Probeexzision)

3.7.3.1. Zytologie vs. Probeexzision zur Identifizierung von CIN II+

Die im Folgenden dargestellte Tabelle 39 zeigt die Resultate der Zytologie im Vergleich zur Probeexzision in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+:

Zytologie	Probeexzision				Summe	
	Positiv [(2), (3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(2), (3), (4), (5)]	159	86,4	12	6,5	171	92,9
Negativ [(0), (1)]	6	3,3	7	3,8	13	7,1
Summe	165	89,7	19	10,3	184	100,0

Tabelle 39: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+

Die Ergebnisse der Zytologie stimmen mit denen der Probeexzision zu 90,2% überein. Die Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,80$ als gut einzustufen. Ferner folgt für die Sensitivität 96,4%, die Spezifität 36,8%, den positiven Prädiktionswert 93,0% sowie für den negativen Prädiktionswert 53,8%.

3.7.3.2. Zytologie vs. Probeexzision zur Identifizierung von CIN III+

In der Tabelle 40 sind die Ergebnisse der Zytologie im Vergleich zur Probeexzision in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+ wiedergegeben.

Zytologie	Probeexzision				Summe	
	Positiv [(3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1), (2)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(3), (4), (5)]	116	63,0	16	8,7	132	71,7
Negativ [(0), (1), (2)]	32	17,4	20	10,9	52	28,3
Summe	148	80,4	36	19,6	184	100,0

Tabelle 40: Kreuztafel Zytologie, Probeexzision nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+

Die Ergebnisse der Zytologie stimmen mit der Probeexzision zu 73,9% überein. Diese Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,48$ als mittelmäßig einzustufen. Ferner ergeben sich als Werte für die Sensitivität 78,4%, die Spezifität 55,6%, den positiven Prädiktionswert 87,9% sowie für den negativen Prädiktionswert 38,5%.

3.7.4. Zytologie vs. Konisation - 184 Fälle

Im Gegensatz zur Tabelle 32 werden nun die Rohdaten der Zytologie ausschließlich versus der Konisation, also nicht der Gesamthistologie, dargestellt.

Zytologie	Konisation						Summe
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
(0)	-	-	-	-	-	-	-
(1)	4	3	1	4	0	1	13
(2)	3	1	7	25	3	0	39
(3)	6	1	3	46	15	0	71
(4)	1	0	2	36	16	3	58
(5)	0	0	0	1	2	1	4
Summe	14	4	13	112	36	5	184

Tabelle 41: Rohdaten Zytologie gegenüber Konisation

3.7.4.1. Zytologie vs. Konisation zur Identifizierung von CIN II+

Die im Folgenden dargestellte Tabelle 42 zeigt die Resultate der Zytologie im Vergleich zur Konisation in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN II+:

Zytologie	Konisation				Summe	
	Positiv [(2), (3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(2), (3), (4), (5)]	160	87,0	11	6,0	171	92,9
Negativ [(0), (1)]	6	3,3	7	3,8	13	7,1
Summe	166	90,2	18	9,8	184	100,0

Tabelle 42: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN II+

Die Ergebnisse der Zytologie stimmen mit denen der Konisation zu 90,8% überein. Die Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,82$ als sehr gut einzustufen. Ferner folgt für die Sensitivität 96,4%, die Spezifität 38,9%, den positiven Prädiktionswert 93,6% sowie für den negativen Prädiktionswert 53,8%.

3.7.4.2. Zytologie vs. Konisation zur Identifizierung von CIN III+

In der Tabelle 43 sind die Ergebnisse der Zytologie im Vergleich zur Konisation in einer Kreuztafel nach der graduellen Einteilung zur Identifizierung von CIN III+ wiedergegeben.

Zytologie	Konisation				Summe	
	Positiv [(3), (4), (5)]		Negativ [(0), (1), (2)]			
	#	[%]	#	[%]	#	[%]
Positiv [(3), (4), (5)]	120	65,2	12	6,5	132	71,7
Negativ [(0), (1), (2)]	33	17,9	19	10,3	52	28,3
Summe	153	83,2	31	16,8	184	100,0

Tabelle 43: Kreuztafel Zytologie, Konisation nach der graduellen Einteilung bzgl. CIN III+

Die Ergebnisse der Zytologie stimmen mit der Konisation zu 75,5% überein. Diese Konkordanzrate ist mit $\kappa = 0,51$ als mittelmäßig einzustufen. Ferner ergeben sich als Werte für die Sensitivität 78,4%, die Spezifität 61,3%, den positiven Prädiktionwert 90,9% sowie für den negativen Prädiktionwert 36,5%.

3.7.5. Zusammenfassung der Vergleiche zwischen zytologischen und histologischen Ergebnissen

Die Ergebnisse der Abschnitte 3.7.1. bis 3.7.4.2. werden hier der Übersichtlichkeit halber noch einmal tabellarisch unter Angabe aller oben dargestellten Kenndaten zusammengeführt.

	Fälle	P ₀	κ	SEN	SPEZ	PPV	NPV
Zytologie vs. Histologie bzgl. CIN II+	350	86,3%	0,73	91,9%	56,4%	91,9%	56,4%
Zytologie vs. Histologie bzgl. CIN II+	184	92,9%	0,86	94,9%	50,0%	97,9%	30,8%
Zytologie vs. Probe- Exzision bzgl. CIN II+	184	90,2%	0,80	96,4%	36,8%	93,0%	53,8%
Zytologie vs. Konisation bzgl. CIN II+	184	90,8%	0,82	96,4%	38,9%	93,6%	53,8%
Zytologie vs. Histologie bzgl. CIN III+	350	71,7%	0,43	68,8%	80,0%	90,9%	47,1%
Zytologie vs. Histologie bzgl. CIN III+	184	76,6%	0,53	76,6%	76,5%	97,0%	25,0%
Zytologie vs. Probe- Exzision bzgl. CIN III+	184	73,9%	0,48	78,4%	55,6%	87,9%	38,5%
Zytologie vs. Konisation bzgl. CIN III+	184	75,5%	0,51	78,4%	61,3%	90,9%	36,5%

Tabelle 44: Zusammenfassung der Zytologie vs. Histologieergebnisse bzgl. CIN II+/CIN III+

4. Diskussion

Die eindeutige Identifizierung einer HPV-Infektion als ätiologische Hauptursache des Gebärmutterhalskrebses hat das Interesse auf HPV-Testungen als einem möglichen Instrument in der Krebsvorsorge im Rahmen von *Screening*-Programmen gelenkt. Die HPV-Tests, welche die Präsenz einer oder mehrerer HPV-Typen anzeigen, können zwar zwischen *high risk*- und *low risk*-Typen bezogen auf das allgemeine Risiko, ein Zervixkarzinom zu entwickeln, unterscheiden, jedoch nicht zwischen klinisch relevanten „transformierenden“ und vorübergehenden „transienten“ Infektionen. Hier liegt das anzunehmende Einsatzgebiet komplementärer Biomarker, wobei sich die Anwendung einer immunhistochemischen p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec® PLUS) in gewisser Weise etabliert hat. Sie stellt simultan die Expression des zyklinabhängigen Kinaseinhibitors p16, welcher bei HPV-Infektionen überexprimiert wird, sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 dar. Zum einen deutet eine p16-Überexpression auf die Aktivität des viralen Onkoproteins E7 hin, zum anderen weist die gleichzeitige Anwesenheit von Ki-67 auf Veränderungen von Zellzykluskontrollen hin. Daher legt eine simultane Expression beider Marker eine transformierende HPV-Infektion nahe [Dona et al. 2012].

Seitens des Herstellers des Originaltests CINtec® PLUS, der Firma Roche mtm Laboratorien AG, wird der Test in einem 2018 aufgelegten Flyer mit dem Titel „*CINtec® PLUS Cytology - Einzigartige Klarheit bei unklaren Befunden*“ beworben [Roche 2017]. Aktuell wird in den vom Hersteller unter <https://www.roche.de/diagnostics/tests-parameter/gewebediagnostik/cintec-plus.html#Downloads-Links> (Stand 31.01.2021) angebotenen Broschüren zusammenfassend als Indikation gesehen ([ANSICHT 3591 FLY CINtec PLUS Zerv A4 \(storyblok.com\)](#), Stand 31.01.2021), dass die Anwendung von CINtec® PLUS sich „zur Abklärung HPV positiver Frauen bei negativem PAP oder ASC-US sowie von zytologischen LSIL Befunden“ eigne. Im Sinne der Münchner Nomenklatur II (bzw. III) bedeutet diese Zuordnung wie folgt:

- der Gruppe I/II (I) bei HPV-Positivität
- der Gruppe II-w (II-p)

- (leichter) Dysplasien der Gruppe IIID (IIID1)

Beim ersten dieser drei Szenarien, nämlich der Testung von HPV-positiven Patientinnen mit Normalbefunden (negativer PAP), wäre eine CINtec® PLUS Anwendung in erster Linie als Suchtest aufzufassen, da die Testung dann Teil der Primärbefundung wäre. Die übrigen beiden Szenarien gehörten in die Gruppe der Reflextestungen, also der weiteren Abklärung bereits zuvor identifizierter auffälliger Befunde.

Im Rahmen der hier vorgelegten Studie ging es insgesamt um die Abklärung von Abstrichzytologien mit dysplastischen Zellveränderungen, also um das dritte Szenarium, so dass im Folgenden vorwiegend hierauf eingegangen werden soll.

4.1. Stellenwert der konventionellen Zytologie zur Vorhersage histologischer Gewebsveränderungen

In den vergangenen ca. 50 Jahren, d.h. seit der Einführung der Zytologie-basierten gynäkologischen Krebsvorsorge im Jahr 1971 (PAP-Test), hat sich gezeigt, dass diese Methode gut geeignet ist histologische Gewebsveränderungen, welche per Biopsie oder Konisation gesichert werden, vorherzusagen. Dieses gilt jedenfalls für die longitudinale Beobachtung von Patientinnen über die Jahre, nicht allerdings bezogen auf einen singulären Abstrich. Verallgemeinernd wird die Aussagekraft der gynäkologischen Zytologie als *Screening*-Methode nicht in Frage gestellt, wenn man sie regelmäßig durchführt. Auch der signifikante Rückgang der Fälle invasiver Zervixkarzinome in den letzten Jahrzehnten geht zu einem großen Anteil auf die gynäkologische Vorsorgezytologie zurück. Außerdem wurde von der Arbeitsgruppe um Marquardt vor einigen Jahren an 617 Fällen aus Mecklenburg-Vorpommern herausgearbeitet, dass innerhalb der Gruppe der invasiven Zervixkarzinome Patientinnen mit Vorgeschichte weniger fortgeschrittene Karzinome aufwiesen als Patientinnen ohne dieser Historie. Bei Frauen mit regelmäßiger Vorsorgeteilnahme (sog. *regular*) waren beispielsweise 83,9% der Karzinome (47 von 56) in den Stadien T1a1, T1a2 und T1b, während es bei Frauen ohne Vorsorgeteilnahme (sog. *none*)

nur 36,7% (137 von 373) waren [Marquardt et al. 2011]. Ähnliche Daten liegen auch aus Schweden vor. Dort wiesen Frauen mit Vorsorgeteilnahme in 81,2% der Fälle Karzinome in den FIGO-Stadien IA bzw. IB auf (358 von 441), diejenigen ohne Vorsorgeteilnahme hingegen in 43,9% (302 von 395) der Fälle [Andrae et al. 2008].

Dass sich die Aussagekraft der gynäkologischen Zytologie von Gruppe zu Gruppe unterscheidet, zeigen die von der Kassenärztlichen Bundesvereinigung öffentlich gemachten aktuellen Jahresstatistiken, von denen die letztveröffentlichte das Jahr 2016 abdeckt [KBV 2017]. Die folgende Tabelle 45 listet diese Statistik auf:

Histologie	Zytologie			
	IID1	IID2	IVa-p	IVa-g
Zahl der Fälle	111.927	62.296	25.161	1.391
Anteil an der Gesamtfallzahl	0,74%	0,41%	0,17%	0,009%
Anteil histologisch geklärter Fälle	4,91%	16,58%	82,85%	82,46%
negativ	19,93%	8,47%	3,07%	7,32%
CIN I	37,82%	12,80%	2,54%	2,53%
CIN II	24,24%	37,95%	8,55%	6,89%
CIN III	17,35%	39,76%	82,24%	55,01%
Adenocarcinoma in situ (AIS)	0,22%	0,29%	0,62%	19,53%
Plattenepithelkarzinom.	0,27%	0,40%	2,48%	2,53%
endozervikales Adenokarzinom.	0,05%	0,09%	0,27%	5,41%
extrazervikale Karzinome	0,11%	0,23%	0,22%	0,78%
Summe (auf +/- 0,01% gerundet)	100%	100%	100%	100%

Tabelle 45: Auszug aus der Jahresstatistik der Gynäkologischen Vorsorgezytologie für das Jahr 2016 (modifiziert nach KBV 2017). Zugrunde liegen insgesamt 15.124.043 Fälle. Die prozentuale Angabe zum „Anteil histologisch geklärter Fälle“ bezieht sich auf die Gesamtzahl der Fälle der jeweiligen Gruppe und berücksichtigt histologische Untersuchungen bis zum 30.06.2017. Die prozentualen Angaben zu den Zeilen „negativ“, „CIN I“ etc. addieren sich spaltenweise auf 100%. Die Zeile „extrazervikale Karzinome“ umfasst in erster Linie, aber nicht ausschließlich Endometriumkarzinome.

Vergleicht man die Korrelation der zytologischen und histologischen Ergebnisse für die einzelnen Gruppen, so zeigt die Tabelle 45 insbesondere eine hohe Korrelation (82,2% bzw. 85,8%) zwischen der Gruppe IVa-p und einer CIN III-Läsion bzw. einer CIN III+ Läsion. Hieraus lässt sich ableiten, dass es bei einem zytologischen Befund der Gruppe IVa-p in aller Regel wohl keiner weiterführenden Biomarker-Anwendung im Sinne eines Bestätigungstests bedarf.

Anders sieht es in den beiden Gruppen IID1 und IID2 aus, welche - allerdings bei nur geringem Prozentsatz histologisch geklärter Fälle von 4,9% bzw. 16,5% - eine recht breite Spanne in Veränderungen gemäß CIN I, CIN II und CIN III zeigen, genau wie dieses nach der Münchner Nomenklatur II für die damalig gemeinsame Kategorie der Gruppe IID auch der Fall war. So wurden im Jahr 2012 von den histologisch geklärten Fällen der Gruppe IID 25,1% als CIN I, 28,8% als CIN II und 30,3% als CIN III eingestuft [Schneider 2014]. Auch wenn die neue Nomenklatur erkennen lässt, dass nun ein gewisser Gradient eingetreten ist, der relativ weniger CIN III-Fälle bei einer Gruppe IID1 (17,4%) und ebenso relativ weniger CIN I-Fälle bei einer Gruppe IID2 (12,8%) ausweist, bleibt doch die Gesamtverteilung breit und lässt so gerade hier Raum für einen ergänzenden Biomarker. Dieser wiederum sollte vorzugsweise dafür genutzt werden die CIN II+ Fälle zu erfassen. So sehen es für die Anwendung der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung auch Ziemke und Griesser, die für das seinerzeit geltende deutsche Modell der Krebsvorsorge in ihrer Arbeit aus dem Jahre 2017 eigene Erfahrungen an 1109 Fällen zusammenfassten. Insbesondere sehen sie einen Sinn in der Doppelfärbung „bei zweifelhaften Befunden der Gruppe III-p und bei persistierender Gruppe IID1“ [Ziemke und Griesser 2017].

4.2. Stellenwert der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung in der Abklärungsdiagnostik auffälliger zytologischer Befunde

4.2.1. Aktuelle Literaturübersicht

Zum Stichtag des 19. April 2020 sind in der Datenbank PubMed bei Eingabe der Suchphrase ("*Cintec plus*" or "*p16/ki-67 dual*" or "*p16/Ki67 dual*") and (*uterine or cervical*)" 89 Publikationen aufgeführt, so dass bereits eine recht große Zahl von Publikationen zur Anwendung der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung in der gynäkologischen Zytologie vorliegt. Wenn man unspezifischer sucht, wie das in Review-Analysen in der Literatur erfolgte [z.B. Chen et al. 2016 und Tjalma 2017], kommt man auf zunächst noch höhere Publikationszahlen, die dann durch Verwendung ergänzender Begriffe wiederum an Zahl reduziert werden können.

Die drei ältesten dieser Arbeiten sowie ein *Editorial* erschienen im Jahr 2011, davon die drei erstgenannten in der eckigen Klammer sogar im gleichen Monat [Petry et al. 2011, Atkins 2011, Schmidt et al. 2011, Yoshida et al. 2011]. Zuvor waren zwar bereits Arbeiten bzgl. p16 und Ki-67 zur Thematik des Zervixkarzinoms durchaus erschienen, neu war allerdings die Durchführung der Färbungen auf einem zytologischen Präparat bzw. histologischen Schnitt als zweifarbige simultane Doppelfärbung anstelle von zwei einzelnen Präparaten bzw. Schnitten. Hierfür kann exemplarisch die frühe Arbeit von Akpolat herangezogen werden [Akpolat et al. 2004]. Ab 2011 ergaben sich hieraus ganz neue Interpretationsmöglichkeiten. Dass das wissenschaftliche Interesse unverändert groß ist, kann man daran ablesen, dass im Jahr 2020 bis zum Stichtag bislang bereits acht Arbeiten zu dieser Thematik erschienen sind.

Wenn man sich auf die prospektive Aussagekraft einer Biomarker-Anwendung bei einer Gruppe IIID bzw. IIID1 fokussiert, so wird es im Wesentlichen darum gehen, eine Voraussage darüber zu treffen, inwieweit sich das Vorliegen einer CIN II+ Läsion aus dem Untersuchungsergebnis ableiten lässt.

In der Tabelle 46 sind zu diesem Aspekt die statistischen Kennwerte von Studien zusammengefasst, die auch in verschiedenen *Reviews* und Meta-Analysen (siehe Tabellenlegende) Berücksichtigung finden. Außerdem wurden Studien aufgenommen, die an *Screening*-Populationen gearbeitet haben.

Studie	Kurzcharakterisierung der Studie	SEN [%]	SPEZ [%]	PPV [%]	NPV [%]
Ikenberg et al. 2013	181 CIN II+/25577 Screenings	86,7	95,2	15,6	99,9
Wentzensen et al. 2015	175 CIN II+/1509 HPV+	83,4	58,9	21,0	96,4
	41 CIN II+/703 HPV+, Cyto-	70,7	70,8	13,1	97,5
Yu et al. 2019	20 CIN II+/1079 Screenings	75,0	79,5	6,5	99,4
	218 CIN II+/463 HPV+	92,7	52,7	63,5	89,0
	48 CIN II+/256 ASCUS, LSIL	87,5	66,4	37,5	95,8
Wright et al. 2017	367 CIN II+/3467 HPV+	70,3	75,6	26,2	95,4
Tay et al. 2017	63 CIN II+/97 Cyto+	93,7	76,5	88,1	86,7
	14 CIN II+/44 ASCUS, LSIL	92,9	76,7	65	95,8
Schmidt et al. 2011	137 CIN II+/415 LSIL	94,2	68,0	59,2	95,9
Uijterwaal et al. 2014	58 CIN II+/256 ASC, LSIL, ASC-H, AGC	89,7	73,1	54,7	95,1
Bergeron et al. 2015	63 CIN II+/384 LSIL	85,7	53,3	26,5	95,0
White et al. 2016	CIN II+/265 LSIL	77,8	88,6	-	-
	CIN II+ / 206 ASCUS	71,9	87,9	-	-
Ordi et al. 2014	378 HSIL, 18 Ca. bei 1123 Fällen	90,9	72,1	63,9	93,6
	580 ASCUS und LSIL	88,9	72,9	37,4	97,3

Killeen et al. 2014	222	94,3	61,9	30,6	98,4
Waldstrøm et al. 2013	469	88,4	51,3	29,0	95,1
Ziemke et al. 2014	107 IID-Fälle mit histologischem und 115 IID-Fälle mit zytologischem Endpunkt	92,4	72,8	79,7	89,3
Zappacosta et al. 2013	3641 HPV-Positive	88,1	39,4	-	-
	246 LSIL-Fälle, Zielpunkt CIN II+	69,5	51,3	31,1	84,2
Ziemke und Griesser 2017	1109 Fälle, davon 75 III-p und 767 IID und höher	93,5	74,5	75,2	93,3
Prigenzi et al. 2018	151 Fälle aller Gruppen, alle biopsiert; Zielpunkt CIN II+	61,5	96,2	61,5	96,2
	69 Fälle davon CIN I/CIN II -	61,5	91,1	61,5	91,1

Tabelle 46: Daten zur Treffsicherheit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung in der gynäkologischen Zytologie nach Reviews und Meta-Analysen. Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität, PPV = positiver Prädiktionswert, NPV = negativer Prädiktionswert (modifiziert nach Chen et al. 2016, Tjalma 2017, Ziemke und Griesser 2017 und Yu et al. 2019). *Kursiv* gesetzte Werte wurden aus den Originaldaten selber errechnet.

Die Datenübersicht zeigt, dass in der Literatur die CINtec[®] PLUS Untersuchung bzgl. CIN II+ Läsionen insbesondere eine gute Sensitivität aufweist. Je nach Studiendesign liegt diese zwischen ca. 70% und 97%. Die Spezifitätswerte schwanken stärker und bewegen sich zwischen knapp 40% und 95%. Der positive Prädiktionswert liegt in einem breiten Intervall von ca. 7% und 88%, der negative Prädiktionswert zwischen 78% und annähernd 100%. Berechnet man modellhaft als Anhaltspunkt jeweils den Median der Datenverteilung, so ergeben sich für die Sensitivität 88,4%, für die Spezifität 72,8%, für den positiven Prädiktionswert 37,5% und für den negativen Prädiktionswert 95,4%. Die Werte sind dabei deswegen nur „Anhaltspunkte“ und keine „harten Daten“, weil in der Tabelle verschiedentlich aus derselben Arbeit mehrere Aspekte erfasst sind und auch nicht immer ganz gleichartige Fragestellungen bearbeitet wurden. Sie sind also nicht frei von Bias.

Für CIN III+ Läsionen, die hier nicht näher betrachtet werden sollen, gilt in der Regel, dass die Werte für die Sensitivität um wenige Prozentpunkte höher liegen. Die Spezifität fällt hingegen meistens um einige Prozentpunkte niedriger aus. Letztendlich bleiben die Ergebnisse aber mit denen für CIN II+ Läsionen vergleichbar. Sehr viel deutlicher, nämlich oft um ca. 10 Prozentpunkte - aber um bis zu 40 Prozentpunkte - sinkt der positive Prädiktionwert ab. Wohingegen der negative Prädiktionwert, welcher ohnehin meistens bei CIN II+ höher liegt, um noch einige Prozentpunkte gar ansteigt. Für weiterführende Details sei an dieser Stelle auf die in der Arbeit von [Yu et al. 2019] eingefügten Tabelle verwiesen. Weswegen hier CIN III+ Läsionen nur cursorisch betrachtet werden sollen, hat damit zu tun, dass in dieser Kategorie von Fällen auch zytologisch oder per HPV-Testung hohe diagnostische Präzision besteht und somit hier die klinische Fragestellung keine vergleichbare Brisanz mit dem Auffinden von CIN II+ Läsionen aufweist.

Allerdings sind in einzelnen Arbeiten veröffentlichte Zahlen und Daten, auch wenn sie korrekt errechnet sind, immer mit gewisser Zurückhaltung zu interpretieren. Dies zeigt exemplarisch ein Blick in die von [Ikenberg et al. 2013] veröffentlichte PALMS-Studie. Die Werte für die Spezifität, den positiven Prädiktionwert und den negativen Prädiktionwert verändern sich nämlich nicht unerheblich in Abhängigkeit davon, welche Fälle als „negativ“ akzeptiert werden (s. Tabelle 47). In der mit 25.557 Fällen sehr großen Studie, in der die gynäkologische Zytologie um einen HPV-Test und die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung ergänzt wurde, wurden von vornherein alle Fälle als „negativ“ kategorisiert, welche mit allen drei Methoden negativ waren (*Triple-negativ*). Außerdem wurden die Patientinnen bei < 30 Jahren Lebensalter mit ausschließlich positivem HPV-Test und alle weiteren Patientinnen, die bei mindestens einer der drei Untersuchungen zwar „positiv“ waren, bei denen aber entweder nicht kolposkopiert oder bei denen im Zuge der Kolposkopie auf eine Biopsieentnahme verzichtet wurde, als „negativ“ kategorisiert. Dass diese Patientinnen wirklich allesamt negativ bezüglich einer CIN II+ Läsion waren, ist streng genommen hypothetisch und unbelegt. Schließt man sie nach und nach aus dem Kollektiv aus, so steigt der positive Prädiktionwert und es sinkt die Spezifität (s. Zeilen B-D der Tabelle 47). Letztendlich gilt dieses aber auch für den Fall, dass man nur histologisch geklärte Fälle akzeptiert hat (Zeile E der Tabelle) - beispielsweise könnte hier die Repräsentativität einer kolposkopischen Biopsie angezweifelt werden. Durch diese Unsicherheiten wird letztendlich indirekt auch die in allen Szenarien „formal“ gleichbleibende

Sensitivität beeinflusst, da sich ja dieser durch jeden - infolge falscher Studiendesignnahmen - falsch negativen Fall verringern werden würde.

Die Angaben, welche von den Autoren selber in einer Tabelle der Arbeit getätigt wurden, geben die zugrunde gelegte Teilmenge am Patientenkollektiv nicht in Zahlen an und weichen unerklärbar von den eigenen Berechnungen ab.

Daten der PALMS-Studie Ikenberg et al. 2013	Datenverteilung bzgl. CIN II+ rp / fp / fn / rn / Summe	SEN [%]	SPEZ [%]	PPV [%]	NPV [%]
A: Alle Fälle (n=25577)	156 / 1297 / 25 / 24099 / 25577	86,2	94,9	10,7	99,9
B: nach Ausschluss der Triple-negativen Fälle (n=21909)	156 / 1297 / 25 / 2190 / 3668	86,2	62,8	10,7	98,9
C: nach Ausschluss der ausschließlich- HPV-positiven Fälle < 30 Jahre (n=645)	156 / 1297 / 25 / 1545 / 3023	86,2	54,4	10,7	98,4
D: nach Ausschluss der Fälle ohne Kolpo- skopie (n=722)	156 / 917 / 25 / 1203 / 2301	86,2	56,7	14,5	98,0
E: nach Ausschluss der kolposkopierten Fälle ohne Histologie (n=1586)	156 / 254 / 25 / 280 / 715	86,2	52,4	38,0	91,8
Angaben bei Ikenberg et al. 2013	----	86,7	95,2	15,6	99,9

Tabelle 47: Daten zur Treffsicherheit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung in der gynäkologischen Zytologie für CIN II+ Läsionen bezogen auf Teilkollektive der PALMS-Studie [Ikenberg et al. 2013]. rp = richtig positiv, fp = falsch positiv, fn = falsch negativ, rn = richtig negativ, Summe = Gesamtzahl berücksichtigter Fälle, Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität, PPV = positiver Prädiktionswert, NPV = negativer Prädiktionswert, alle Angaben in Prozent. Als „negativ“ wurden in der PALMS-Studie alle Triple-negativen Fälle (HPV, Zytologie, CINtec[®] PLUS) gewertet, ebenso alle Fälle mit ausschließlicher HPV-Positivität < 30 Jahre Lebensalter, außerdem alle kolposkopierten Fälle, bei denen auf eine Histologieentnahme verzichtet wurde.

An dem Trend der Zahlen - auch in den übrigen Arbeiten der Tabelle 46, jeweils abhängig vom zugehörigen Endpunkt - ändern diese Überlegungen allerdings nichts. Dennoch ist aus ihnen klar zu entnehmen, dass die Erfahrungen mit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung

in der Literatur unabhängig von den konkreten Zahlen auf eine hohe Sensitivität und einen negativen Prädiktionswert sowie auf eine mittlere Spezifität und einen niedrigen positiven Prädiktionswert deuten. Übersetzt in „die klinische Sprache“ bedeuten eine hohe Sensitivität und ein hoher NPV, dass zum einen viele Erkrankte (= CIN II+) vom Test erkannt werden, und zum anderen, dass bei einem negativen Testergebnis eine Erkrankung unwahrscheinlich ist. Der relativ niedrige positive Prädiktionswert wiederum geht auf die relativ vielen falsch positiven Testergebnisse mit mittlerer Spezifität zurück und weist aus, dass bei einem positiven Testergebnis nur in recht wenigen Fällen eine Erkrankung gefunden wird.

4.2.2. Eigene Ergebnisse

Alle 350 in unserer Studie eingeschlossenen Fälle entstammten der Dysplasiesprechstunde der Frauenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD). Die auffälligen zytologischen Vorbefunde, aufgrund derer die Patientinnen in die Dysplasiesprechstunde gelangten, waren nahezu alle auswärts erhoben und uns daher nicht bekannt, sofern sie nicht in manchen Fällen anamnestic auf dem Einsendeschein angegeben waren. Alle 350 untersuchten zytologischen Präparate entsprachen dabei konventioneller Zytologie und enthielten mindestens leichte Dysplasien (Gruppe IIID (MN2), IIID1 (MN3) bzw. LSIL). Der HPV-Status der Patientinnen war üblicherweise nicht angegeben. Bezogen auf die histologische Klärung, bei der nicht in allen Fällen auffällige Zellveränderungen nachgewiesen wurden, ergab sich als Besonderheit, dass viele der operativen Eingriffe noch am Tag der zytologischen Abstrichentnahme durchgeführt wurden und somit das zytologische Untersuchungsergebnis erst postoperativ erhoben wurde.

Zur allgemeinen wissenschaftlichen Charakterisierung und Aufarbeitung der Studiengruppe - gesammelt zwischen Dezember 2008 und August 2012 - kann auf die Untersuchung von [Müller 2015] verwiesen werden. Auf die damals nach Papanicolaou gefärbten und archivierten Proben wurde die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (CINtec[®] PLUS) angewandt, um die Leistungsfähigkeit dieses Biomarkers in der LSIL- / HSIL-Abgrenzung

mit den Ergebnissen der Zytologie sowie der Histologie (Probeexzision und / oder Konisation) vergleichen zu können.

Die in Kapitel 3.5. (Tabelle 15) zusammengestellten Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die Sensitivität der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung am eigenen Material bezogen auf das zytologische Untersuchungsergebnis bei 68,5%, die Spezifität bei 65,5%, der positive Prädiktionwert bei 91,4% und der negative Prädiktionwert bei 27,9% lag. Ähnliche Kombinationen von Werten ergaben sich auch im Vergleich der für alle 350 Patientinnen histologischen Biopsiediagnostik (68,7%; 60,6%; 88,2%; 31,0%) und der an einem Teilkollektiv von 184 vorgenommenen histologischen Konisationsdiagnostik (71,7%; 38,9%; 91,5%; 13,0%). Vergleicht man diese Zahlen mit den oben genannten Anhaltspunkten aus der Literatur, so weichen die eigenen Ergebnisse deutlich ab.

Weniger aussagekräftig in unserer Studie sind im Vergleich zur Literatur die Werte für Sensitivität und Spezifität. Nur ca. zwei Drittel der insgesamt von einer CIN II+ Läsion betroffenen Fälle wiesen bei auffälliger Zytologie ein positives Färbergebnis in der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung auf (SEN zwischen 68,5% und 71,7%). Damit liegt das Ergebnis um bis zu 20 Prozentpunkte unterhalb des medianen Ergebnisses aus der Literatur. Auch die Spezifität der Untersuchung war deutlich geringer, was den Einsatz der Testung als Suchtest nicht optimal erscheinen lässt.

Andererseits fällt im Vergleich zur Literatur der viel höhere positive Prädiktionwert auf. D.h. die Patientinnen in deren Abstrich mit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung auffällige Plattenepithelien detektiert wurden, waren zu einem hohen Prozentsatz auch wirklich an einer CIN II+ Läsion erkrankt. Damit leistet die Untersuchung einen sehr wesentlichen Beitrag bezüglich eines Bestätigungs- oder Reflextests. Dieser hat ja - in Abgrenzung gegenüber einem Suchtest - nicht die primäre Aufgabe „Alarm zu schlagen“, sondern soll einen bereits bestehenden Verdacht mit einer adjuvanten Methode verdichten. Dieses wird mit einem hohen positiven Prädiktionwert erreicht, so dass hier ein gutes und auch

klinisch nutzbares Ergebnis vorliegt. Fand sich bei einer Patientin ein positives Testergebnis, so wies sie mit einer Wahrscheinlichkeit von 88,2% bzw. 91,5% eine CIN II+ Läsion bei der Biopsie bzw. Konisation auf.

Ebenso recht eindeutig war das Ergebnis für den negativen Prädiktionswert bzgl. einer CIN II+ Läsion, der in unserem Kollektiv, wiederum in Abweichung zur Literatur, vergleichsweise niedrig und somit gut war. Er wies allerdings zwischen den drei betrachteten Korrelationen zu Zytologie, Biopsie und Konisation stärkere Schwankungen auf. Dennoch lässt sich sagen, dass bei einem negativen Testergebnis die Wahrscheinlichkeit einer Patientin mit auffälliger Zytologie wirklich an einer CIN II+ Läsion erkrankt zu sein mit 13% bis 31% relativ gering ist. Entsprechend kann man auch mit dem zweiten bei einem Bestätigungstest wichtigen Kennwert durchaus zufrieden sein.

Eindeutige Erklärungen für diese Unterschiede zur Literatur lassen sich nicht herausarbeiten, da sich die möglichen Einflussgrößen nicht quantitativ darstellen lassen.

Fest steht, dass sowohl die Zytologieassistentinnen, als auch die Fälle validierenden Fachärztinnen und -ärzte mit der technischen Qualität der konventionellen Ausstrichpräparate nicht immer zufrieden waren, weil sie zum Teil zu dick ausgestrichen waren und/oder Fixationsartefakte aufwiesen - eine Art Qualitätskataster wurde aber nicht geführt. In der oben bereits erwähnten PALMS-Studie aus [Ikenberg et al. 2013] wurden zwischen konventionellen Ausstrichen und Dünnschichtpräparaten allerdings keine wesentlichen Unterschiede für die Sensitivität bzw. die Spezifität ermittelt. Dort ergaben sich für die konventionelle Ausstriche 87,2% bzw. 95,8%, für die *SurePath*-Präparate 88,1% bzw. 95,1% und für die *ThinPrep*-Präparate 95,6% bzw. 95,0%, so dass hier kein erkennbarer Nachteil bei der Verwendung konventioneller Ausstrichpräparate gefunden wurde.

Ein anderer Aspekt ist sicher, ab welchem Braun- bzw. Rotfärbeton man eine Färbung bereit war, als „eben schon positiv“ gegenüber „gerade noch negativ“ zu akzeptieren. Beide Färbungen zeigten sich in allen Farbschattierungen von sehr zart bis sehr kräftig. Die Vorgabe an der Cytopathologie am UKD bei der Auswertung war das Prinzip der

Eindeutigkeit der Anfärbung, so dass im Grunde rein subjektive Interpretationen, allerdings stets unter Anwendung eines „Vier-Augen-Prinzips“, getätigt wurden. Vor diesem Problem stehen aber andere Arbeitsgruppen auch, wenn man nicht bildanalytische Verfahren verwenden möchte. Dies letztgenannten sind jedoch an konventionellen Präparaten nicht recht denkbar. Eine grundlegende bildanalytische Arbeit an Dünnschichtpräparaten, in der auch die mathematischen Hintergründe der verwendeten *support vector machines*-Klassifikatoren behandelt wurden, ergab für die Zuordnung von Zellen zu p16+ / Ki-67+ zwischen dem bildanalytischen Ergebnis und der Klassifikation durch zwei Zytopathologen eine Übereinstimmung von 77,1% bzw. 82,6%, also ein recht gutes, aber möglicherweise für einen klinischen Einsatz noch nicht ausreichendes Ergebnis [Gertych et al. 2012]. Durchgesetzt haben sich bildanalytische Ansätze in der p16^{INK4a}/Ki-67-Diagnostik bislang nicht.

Die wenigen Reproduzierbarkeitsstudien zwischen verschiedenen Untersuchern sind wiederum komplex angelegt, so dass eine genauere Datenanalyse den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Die Zahlen der *Kaiser-Permanente*-Studie von [Wentzensen et al. 2015], bei der zehn Untersucher jeweils ein Teilkollektiv von 160 Fällen mit jeweils 12 bis 13 CIN II+ Fällen im Vergleich zum Referenzergebnis beurteilten, ergaben Übereinstimmungen zwischen 82,5% und 91,1%. Dies spricht im Wesentlichen für eine gleichartige Beurteilung der Färbung. Ähnlich wurde in einer Arbeit aus Slowenien, in der die Diagnostiker dreier Labore im Allgemeinen verglichen wurden, Übereinstimmungen zwischen jeweils zwei Laboren in der Auswertung der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung von 129 Fällen zwischen 82,2% bis 86,8% ermittelt, die sich aber mit zusätzlicher Schulung/Übung auf 93,0% bis 93,8% steigern ließen - betrachtete man alle drei Labore gemeinsam, so lagen die Werte bei 77,5% bzw. 89,9% [Prevodnik et al. 2019].

Interessant ist auch der Vergleich zwischen intraspezifischer Reproduzierbarkeit (jeweils einer von drei Untersuchern, zweimalige Befundung) und interspezifischer Reproduzierbarkeit (drei Untersucher, einmalige Befundung), der in einer 469 Fälle umfassenden Studie aus Schweden an einem Teilkollektiv von 185 LSIL-Fällen dargelegt wurde [Waldström et al. 2013]. Für die drei paarweisen Vergleiche zur intraspezifischen Reproduzierbarkeit ergab sich eine mittlere Übereinstimmung von 77,7%, für die drei paarweisen

Vergleiche zur interspezifischen Reproduzierbarkeit von 79,8%. Die zugehörige mediane Übereinstimmung lag bei 71,9% bzw. 82,2%.

Dass in den eigenen Daten die Werte für den PPV so gut und für den NPV immer noch gut ausfallen hat auch mit dem Patientinnenkollektiv zu tun. Es besteht ausschließlich aus Fällen, die bereits in die Dysplasiesprechstunde der Frauenklinik des UKD überwiesen worden waren, so dass mindestens ein, wenn nicht mehrere frühere auffällige zytologische Vorbefunde als Indikation für diese Überweisung vorhanden waren. Vermutlich waren es in vielen Fällen auch mehrere solcher auffälliger Befunde, da insbesondere Patientinnen mit einer Gruppe IIID bzgl. der Münchner Nomenklatur II nach den früheren Vorgaben des Krebsvorsorgeprogramms nicht üblicherweise bereits bei einem auffälligen Erstbefund in eine Spezialsprechstunde überwiesen wurden. Entsprechend ist unser Krankengut in gewisser Weise „angereichert“, was eindeutigere Werte für den PPV und den NPV begünstigt.

Auf die Frage, inwieweit sich die Ergebnisse zwischen einem Vergleich mit einer Biopsie oder einer Konisation unterscheiden, soll abschließend hier noch einmal kurz eingegangen werden. Die entsprechenden Werte für Sensitivität, Spezifität, positiven Prädiktionswert und negativen Prädiktionswert waren oben bereits kurz wiedergegeben worden. Sie sind sich so ähnlich, dass offenbar in der Regel bereits mit der Biopsie die Läsion erfasst wird. Dieses lässt darauf schließen, dass diese in der großen Mehrzahl der Fälle kolposkopisch sichtbar gewesen sein und nicht im tiefen Zervikalkanal gelegen haben wird. Andererseits wird eine Empfehlung abgegeben werden müssen, dass bei einem Biopsieergebnis, das zur Zytologie und/oder zur p16^{INK4a}/Ki-67-Diagnostik diskrepanz ist, immer an eine Lage der Läsion im tiefen Zervikalkanal gedacht werden und eine entsprechende nachfolgende Diagnostik erfolgen muss. Dies gilt besonders für ältere Frauen, bei denen physiologischerweise die insbesondere von der Dysplasiebildung gefährdete ekto-endozervikale Übergangszone dort zu erwarten ist.

4.3. Weitere Anwendungen der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung in der gynäkologischen Zytologie

Die Anwendungen der p16^{INK4a}/Ki-67 Immunzytochemie beschränken sich in der Literatur nicht ausschließlich auf die Detektion von CIN II+ oder CIN III+ Läsionen bei bereits zytologisch dysplastischen Zellveränderungen ab einer Kategorie der Gruppe IIID (nach der Münchner Nomenklatur II) oder LSIL (nach dem Bethesda-System), sondern wurden auch an zytologisch unauffälligen Befunden und an Fällen der Kategorie ASCUS (nach dem Bethesda-System), im Wesentlichen der Gruppe II-p (nach der Münchner Nomenklatur III) gleichend, vorgenommen. Auch wenn in der eigenen Studie solche Fallgruppen nicht mitgeführt wurden, sollen im Folgenden die Erfahrungen hiermit dargestellt werden.

4.3.1. Leistungsfähigkeit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung bei negativer gynäkologischer Zytologie und positivem HPV-Befund

Die Konstellation eines negativen zytologischen Abstriches (Gruppe I bzw. NILM) und eines positiven HPV-Tests war früher selten, wird seit dem 1. Januar 2020 aber häufiger beobachtet. Diese zeitliche Zäsur geht darauf zurück, dass früher HPV-Tests üblicherweise nur bei Verdacht auf eine Läsion durchgeführt wurden, nunmehr aber Teil des Krebsvorsorgeprogramms bei Frauen ab 35 Jahren sind. Im Folgenden soll auf zwei grundlegende Studien mit solchen Befunden eingegangen werden.

Eine zu dieser Thematik wesentliche Studie bei Frauen ab 30 Jahren führten [Wentzensen et al. 2015] im Rahmen der *Kaiser Permanente*-Studie an insgesamt 1509 Fällen auf der Basis von Dünnschichtzytologien durch. In 703 Fällen war dabei in der Vergangenheit kein positiver zytologischer Befund aufgefallen. Am Ende der Studie fand sich bei 41 (5,8%) dieser Patientinnen eine CIN II+ Läsion. Die 226 (32,1%) der 703 Patientinnen unterzogen sich unmittelbar nach der Diagnostik einer Kolposkopie mit Biopsie, welche

zu 14 (6,2%) CIN II+ Diagnosen führte. Die übrigen 477 (67,9%) Patientinnen unterzogen sich nach einem Jahr einem erneuten HPV-Test und einer erneuten Zytologie. Dabei trat für 128 (26,8%) Fälle erneut die Konstellation positiver HPV-Test und negative Zytologie auf. Davon erhielten 120 Patientinnen, also die große Mehrheit von ihnen (93,8%), eine Biopsie. Dabei befanden sich sechs (5,0%) CIN II+ Läsionen. Unter den verbleibenden 349 (= 477 – 128) Fällen waren 110 (31,5%), die sowohl HPV-positiv geblieben waren, als auch jetzt eine auffällige Zytologie zeigten. Von 105 Biopsierten wiesen 21 (20,0%) eine CIN II+ Läsion auf. Schließlich waren 235 Patientinnen in beiden Tests negativ und vier zeigten bei HPV-Negativität eine auffällige Zytologie an.

Zusammenfassend waren somit mit 6,2% und 5,0% die CIN II+ Quoten bei sofortiger Kolposkopie mit Biopsie oder mit einjähriger Verzögerung nach Bestätigung durch eine erneute Co-Testung fast gleich und insgesamt ungefähr 10-mal höher als in einer normalen *Screening*-Population, welche die KBV-Zahlen von 2017 zugrunde legen (siehe oben). Insofern stellt die Konstellation „HPV-positiv & Zytologie negativ“ eine Risikosituation dar. Aber erst das Hinzutreten auffälliger Zellen im Abstrich lässt die Quote an gefundenen CIN II+ Läsionen signifikant, nämlich auf 20%, ansteigen. Ähnlich war das Ergebnis auch für die Gruppe von Patientinnen, welche anamnestisch schon einmal ein positives Zytologieergebnis gehabt hatten und anschließend HPV-positiv waren. Hierbei handelte es sich um 544 Frauen (36,1%), von denen 463 (85,2%) biopsiert wurden. Dabei wurden 107 (23,1%) CIN II+ Läsionen gefunden. Die Erfahrungen, die man in der *Kaiser Permanente Studie* für Frauen mit oder über 30 Jahren bzgl. der Konstellation „HPV positiv & Zytologie negativ“ gesammelt hat, sind in der Reform der gynäkologischen Krebsvorsorge in Deutschland zum 1. Januar 2020 berücksichtigt worden, indem der Abklärungsalgorithmus eine eigens für solche Patientinnen entwickelte Strategie beinhaltet.

Bei allen 703 (100,0%) primären Abstrichen wurde ergänzend eine p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung durchgeführt, welche ab Nachweis einer positiven Epithelzelle (unabhängig von deren Morphologie) als positiv bewertet wurde. Bezogen auf alle 703 Fälle waren 31,6% der Färberesultate positiv, obwohl nur 5,8% eine CIN II+ Läsion aufwiesen. Innerhalb der 41 Fälle von CIN II+ Läsionen waren 70,7% positiv sowie innerhalb der 235 Fälle, die nach erneuter Co-Testung negativ für HPV und in der Zytologie waren, waren

20% positiv. Dies bedeutet, dass letztendlich der Untersuchung hier nur fraglich ein wirklich klinischer Nutzen zugesprochen werden kann, da zu viele positive Tests ohne zugrunde liegender Läsion auftraten (PPV = 13,1%). Als weitere Kennzahlen wurden für die Sensitivität 70,7%, für die Spezifität 70,8% und für den NPV 97,5% angegeben.

Zuvor war bereits ähnlich an einem kleineren Kollektiv (425 Fälle) im Rahmen der Wolfsburg-Studie [Petry et al. 2011] die klinische Wertigkeit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung zur Identifizierung von CIN II+ bzw. CIN III+ bei dieser Fallkonstellation untersucht worden. Dies geschah ebenfalls an Dünnschichtzytologien von Patientinnen mit einem Alter von ≥ 30 Jahren. Mit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung wurden in 108 Fällen (25,4%) positive Zellen identifiziert. In der mit der Doppelfärbung positiven Gruppe lag die Quote von CIN II+ Läsionen bei 31,5% (34 von 108), bei der negativen Gruppe bei 0,9% (3 von 317), wobei das *Follow-Up* relativ kurz war und nur bei 132 (31,0%) Patientinnen kolposkopisch gewonnene Biopsien vorlagen. Insgesamt wurden 34 der 37 CIN II+ Läsionen in Fällen gefunden, in denen die Zytologie mit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung positiv gewesen war. Von 95 Fällen, deren Zytologie in der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung hingegen negativ beurteilt worden war, wiesen 17 weitere CIN II+ Läsionen auf. Hieraus errechnete sich eine Sensitivität von 91,9%, eine Spezifität von 82,1%. Ferner führte dies zu einem positiven Prädiktionwert von 66,7% und einem negativen Prädiktionwert von 96,3%. Zu berücksichtigen ist allerdings bei diesen Werten, dass in der Studie durch die relativ geringe Zahl für das histologische *Follow-Up* verbliebener Patientinnen (132 von 425, d.h. 31,1%) ein gewisser Bias entstanden sein könnte - hierfür spricht die für eine Screening-Population sehr geringe Zahl von CIN I-Diagnosen von 1,9% (2 von 108) in der Gruppe der Patientinnen mit positivem Ergebnis in der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung und von 7,3% (23 von 317) in der negativen Gruppe. Insofern ist zu fragen, inwieweit die Idee der Autoren, man könne mit der Anwendung der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung die Zahl an Kolposkopien reduzieren, wirklich trägt.

Als dritte Arbeit soll eine Publikation aus Utrecht von [Uijterwaal et al. 2015] erwähnt werden, bei der die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung an 408 zytologischen Abstrichen mit einem Normalbefund durchgeführt wurden. Davon fielen 131 (32,1%) Färbungen positiv aus. Die übrigen 277 (67,9%) Fälle fielen negativ aus. Alle Patientinnen waren HPV-HR-

positiv getestet worden und verfügten entweder über ein 3-Jahres-*Follow-Up* mit negativer Zytologie (75,7%) oder wiesen eine positive Zytologie ab HSIL (1,5%) bzw. eine histologische Abklärung (22,8%) auf. Insgesamt traten bei ihnen 48 (11,8%) CIN II+ Läsionen zutage. Die Sensitivität der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung betrug für sie 68,8%, die Spezifität 72,8%, der positive Prädiktionwert 25,2% und der negative Prädiktionwert 94,6%.

4.3.2. Leistungsfähigkeit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung bei zytologischem ASCUS-Befund bzw. LSIL-Befund

Publikationen zu eher als gering einzustufenden zytologischen Veränderungen liegen in aller Regel bezogen auf die Bethesda-bezogene Nomenklatur des ASCUS (*atypical squames of uncertain significance*) oder des LSIL (*low grade squamous intraepithelial lesion*) vor, was sich in der in Deutschland verwendeten Münchner Nomenklatur III auf die beiden Gruppen II-p (ASCUS) bzw. IIID1 (LSIL) beziehen lässt. Da manchmal zwischen beiden Gruppen in den Veröffentlichungen nicht getrennt wird, sollen sie hier gemeinsam besprochen werden. Insgesamt lässt sich sagen, dass auch für diese beiden Gruppen bezogen auf das Vorliegen einer CIN II+ Läsion bei positivem Ausfall einer p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung überwiegend positive Erfahrungen vorliegen. Insgesamt schwanken die Werte für die Sensitivität und die Spezifität für diese Studien, übersichtlich in der Publikation von [Ordi et al. 2014] zusammengestellt, zwischen 62,3% und 92,2% bzw. zwischen 51,3% und 82,2%. Sie sind also durchaus variabel. In einer aktuellen Übersicht aus dem Jahr 2019 von [Peeters et al. 2019] werden für die Sensitivität mittlere Werte von 84% bzgl. ASCUS und von 86% bzgl. LSIL genannt. Die Spezifitätswerte liegen bei 77% bzw. 66%. Bezogen auf CIN III+ liegen die Werte für die Sensitivität höher, nämlich 88% bzw. 96%, und die Werte für die Spezifität niedriger, nämlich 72% bzw. 47%.

Mittelwerte für die Treffsicherheit der p16 ^{INK4a} /Ki-67-Doppelfärbung	Zahl der Studien	SEN [%]	SPEZ [%]
CIN II+			
ASCUS	13	84 (77-89)	77 (70-82)
LSIL	18	86 (82-89)	66 (59-72)
CIN III+			
ASCUS	5	88 (58-98)	72 (67-76)
LSIL	6	96 (88-98)	47 (36-58)

Tabelle 48: Daten zur mittleren Treffsicherheit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung in der gynäkologischen Zytologie mit Diagnosen von ASCUS bzw. LSIL für das Vorliegen einer CIN II+ Läsion oder einer CIN III+ Läsion nach Peeters et al. 2019. Angaben zur Sensitivität und Spezifität in Prozent unter Angabe des Mittelwertes und des 95%-Konfidenzintervalls.

Einige größere Studien sollen im Folgenden angesprochen werden. Die Studie von [Ordi et al. 2014] aus dem Jahre 2014 an 1.123 zytologischen Abstrichen mit obligatorischem Nachweis von HR-HPV enthielt eine Untergruppe von 580 Fällen, von denen mit 509 die allermeisten als LSIL (66,2%) oder ASCUS (21,6%) eingestuft worden waren. Die übrigen 71 wurden als normal (6,2%), als ASC-H (5,0%) oder als AGC (1,0%) eingestuft. Bezogen auf diese Fälle betragen die Sensitivität bei positivem Färbeergebnis für eine CIN II+ Läsion 88,9% und die Spezifität 72,9%. Für den positiven Prädiktionwert bzw. den negativen Prädiktionwert errechneten sich 37,4% bzw. 97,3%. Den Autoren war wichtig herauszustellen, dass bei vergleichbaren übrigen Kennwerten die Spezifität der Untersuchung fast genau doppelt so hoch war wie die der per HC2-Testung durchgeführten HPV-HR-Analyse (36,7%), wodurch man sich eine Reduktion von notwendigen Kolposkopien erhoffen könne.

Ferner wäre die EEMAPS-Studie von [Schmidt et al. 2011] aus dem Jahre 2011 zu nennen. In dieser wurden u.a. Abstriche von 776 Frauen mit *low-grade*-Veränderungen in der Zytologie, von denen die meisten HR-HPV-positiv waren (78,4%), ausgewertet. Die Befunde bzgl. ASCUS (46,5%) und LSIL (53,5%) wurden hier getrennt betrachtet, wobei die Ergebnisse gut vergleichbar waren. Wertet man sie zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien gemeinsam aus, so ergeben sich eine Sensitivität von 93,5% und eine

Spezifität von 77,2%. Für den positiven Prädiktionswert bzw. den negativen Prädiktionswert ergeben sich 59,2%, bzw. 40,8%. Zusammenfassend gingen die Autoren davon aus, dass man mit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung eine Triagierung von Patientinnen mit ASCUS- und/oder LSIL-Befunden vornehmen könne. Außerdem sahen sie einen Vorteil in der Doppelfärbung im Vergleich zu der vorher erprobten einfachen p16^{INK4a}-Markierung plattenepithelialer Läsionen.

Schließlich soll noch die ebenfalls recht große Studie von [Waldstrøm et al. 2013] aus dem Jahre 2013 erwähnt werden. Diese erfasste 469 Patientinnen, davon 324 (69,1%) HPV-HR-positiv mit LSIL-Zytologie. Im Rahmen des *Follow-Ups* wurden 87 (18,6%) CIN II+ Läsionen gefunden. Die 259 (55,2%) Patientinnen wiesen Normalbefunde auf und die übrigen 123 (26,2%) zeigten im Verlauf wiederum *low-grade*-Veränderungen (ASCUS, LSIL bzw. CIN I) an. Auch in dieser Studie ergab sich für die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung mit 88,5% eine hohe Sensitivität. Die Spezifität lag bei 51,3%, der positive Prädiktionswert bei 29,3% und der negative Prädiktionswert bei 95,1%. Konkrete Schlüsse für eine spezielle Vorgehensweise aus der Diagnostik wurden von den Autorinnen hier nicht gezogen. Insbesondere wurde die nur mittlere Konkordanz der Ergebnisse des HPV-Tests und der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung von 69,5%, die für eine gewisse Unabhängigkeit der beiden Untersuchungsmethoden voneinander spricht, nicht weiter diagnostisch ausgewertet.

Zu deutlich niedrigeren Werten kommt die Arbeit von [White et al. 2016] aus dem Jahre 2016 bzgl. 471 zytologischer Abstriche von Patientinnen mit mehrfacher ASCUS- oder LSIL-Diagnose. Für die Sensitivität der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung zur Erkennung einer CIN II+ Läsion - bezogen auf ein *Follow-Up*-Intervall von zwei Jahren - ergab sich ein Wert von 75,4% und für die Spezifität ein Wert von 88,3%. Dafür errechnen sich mit 72,7% bzw. 89,6% relativ hohe Werte für den positiven Prädiktionswert bzw. den negativen Prädiktionswert. Von den im HPV-HR-Test (HC2) positiven Fällen, die auch mit der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung positiv waren, wiesen 74,1% eine CIN II+ Läsion auf. Für die negativen Fälle galt ein Wert von 15,6%. Außerdem zeigten sich kaum Fälle mit HPV-HR-Negativität und positivem Resultat der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung (4 von 471). Die Ergebnisse der Studie lassen sich daher so interpretieren, dass eine p16^{INK4a}/Ki-

67-Doppelfärbung in HPV-HR-positiven Fällen mit *low grade*-Veränderungen zur besseren Detektion einer CIN II+ Läsion nachgeschaltet werden kann.

Ebenso gelangte eine Arbeit aus Italien von [Zappacosta et al. 2013] aus dem Jahre 2013 zu niedrigeren Werten. Die Autoren befassten sich mit 405 Fällen zytologischer Abstriche, von denen 246 (60,7%) als LSIL eingeordnet wurden. Im Rahmen der histologischen Klärung wurden davon 59 (24,0%) als CIN II+ Läsionen befunden und die übrigen 187 (76,0%) wurden niedriger eingestuft. Für die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung, welche in 132 zytologischen Präparaten positiv war, ergaben sich für die Sensitivität 69,5% und für die Spezifität 51,3%. Der positive Prädiktionwert betrug 31,1% und der negative Prädiktionwert lag bei 84,2%.

4.4. Zukunft der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung nach der Reform der gynäkologischen Krebsvorsorge zum 1. Januar 2020

Fasst man alle Studienergebnisse zusammen, so ist die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung durchaus als ein zusätzlicher Biomarker in der Abklärung zytologischer Befunde unter verschiedenen klinischen Szenarien einsetzbar, auch wenn sich nicht in allen Studien eine gleichermaßen gute Eignung herausarbeiten lässt. Insofern liegt hier sicher eine sinnvolle, in der Literatur vielfach belegte und auch in unserem speziellen Ansatz bestätigte, Anwendung vor. Dabei sollte allerdings auch darauf hingewiesen werden, dass so manche Studie über die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung, darunter insbesondere die mit exzellenten Ergebnissen, vom Hersteller von CINtec[®] PLUS, also der Firma Roche mtm Laboratorien AG, gesponsort wurde. Daher eigentlich auch als Industrieforschung eingeordnet werden könnte, und dass deren wissenschaftlicher Leiter Herr Rüdiger Ridder bei vielen Publikationen als Co-Autor auftritt. So geschehen auch bei einigen hier zitierten Arbeiten, wie [Bergeron et al. 2015, Petry et al. 2011, Petry et al. 2016, Polman et al. 2017, Schmidt et al. 2011, Stoler et al. 2018, Stoler et al. 2020, Ikenberg et al. 2013, Uijterwaal et al. 2014, Uijterwaal et al. 2015, Reuschenbach et al. 2012 und Wright et al. 2017].

Worauf im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden konnte, sind Korrelationen der Ergebnisse mit denen der HPV-HR-Testung. Dieses hat auch damit zu tun, dass der HPV-HR-Status unserer Patientinnen im Regelfall bei der Diagnostik nicht mit übermittelt wurde. Dass eine große Zahl von ihnen HPV-HR-positiv sein dürfte, kann man allerdings vor dem Hintergrund eines wiederholten auffälligen Zytologiebefundes sicher voraussetzen.

Die zum 1. Januar 2020 eingeführte grundlegende Reform der gynäkologischen Krebsvorsorge billigt nun der HPV-HR-Bestimmung eine große Bedeutung zu, insbesondere bei Frauen im Alter ab 35 Jahren. Hierdurch hat sich die Gewichtung sowohl der Zytologie, als auch adjuvanter Methoden deutlich verändert und führt bereits jetzt, ein gutes Jahr nach ihrem Inkrafttreten, zu deutlichen Verschiebungen in der Wahl von Untersuchungsmethoden, welche eindeutig auch zu Lasten der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung gehen.

Der Reform selber ging, nachdem am 9. April 2013 das Krebsfrüherkennungs- und Registergesetz (KFRG) in Kraft getreten war, eine mehrjährige intensive Diskussion über das Pro und Contra von Vorschlägen voraus, wobei neben wissenschaftlichen Argumenten auch gesundheitspolitische und insbesondere auch wirtschaftliche Aspekte bestimmter Interessengruppen zu bedenken waren¹. Entsprechend schwierig war offenbar auch die Findung eines tragfähigen Konzeptes, das alle beteiligten Interessenvertreter im Wesentlichen zufriedenstellen konnte. Der Wortlaut der neuen Richtlinie, welche am 22. November 2018 beschlossen und am 21. Mai 2019 veröffentlicht wurde ist im Herbst 2019 inklusive der „Tragenden Gründe“ auch in der Fachliteratur präsentiert worden [N.N. 2018 und N.N. 2019].

Neben der Neuerung, dass von einem sogenannten „opportunistischen Modell“ auf ein Einladungsmodell umgestellt wird, kann man die Veränderungen wie folgt kurz zusammenfassen:

¹ Der zeitliche Verlauf der Beschlussfindung von 2013-2018 ist in Tabelle 4 der „Tragenden Gründe“ [N.N. 2018] detailliert wiedergegeben.

Zum einen werden die Patientinnen in drei Altersgruppen mit verschiedenen Untersuchungsmethoden unterteilt und zum anderen konkrete Handlungsanweisungen vorgegeben, wie man beim jeweiligen Befund im weiteren klinischen Ablauf zu verfahren hat.

Sofern sich an diese Vorgaben im Einzelfall gehalten wird, ergäbe sich als neue zugehörige Vorgehensweise folgendes:

- Bei Teilnehmerinnen an der Krebsvorsorge, die zwischen 20 und 29 Jahre alt sind, bleibt es bei der jährlichen zytologischen Untersuchung, bei Befunden der Gruppen II-p, II-g und IIID1 wird eine zytologische Kontrolle nach 6 bis 12 Monaten vorgenommen. Alle „höherwertigen“ Veränderungen führen zu einer Kolposkopie innerhalb von drei Monaten (III-p, III-g, IIID2) bzw. unverzüglich (IV, V mit jeweils allen Untergruppen). Der Einsatz von Biomarkern oder von HPV-Testungen ist nicht vorgesehen.
- Bei Teilnehmerinnen an der Krebsvorsorge, die zwischen 30 und 34 Jahre alt sind, bleibt es ebenfalls bei der jährlichen zytologischen Untersuchung, bei Befunden der Gruppen II-p, II-g und IIID1 wird nach 6 bis 12 Monaten ein HPV-Test durchgeführt. Der zwischenzeitlich überlegte alternative Einsatz einer p16-/Ki-67-Doppelfärbung statt einer HPV-Testung, wie er noch im Dezember 2017 in Kapitel 13.1 („Abklärungsszenarien in Abhängigkeit der Screeningstrategie“) des „Leitlinienreport zur S3-Leitlinie *Prävention des Zervixkarzinoms*“ für etwas jüngere Frauen (25-30 Jahre) in der Diskussion gewesen war, wurde bis zum Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses im November 2018 komplett verlassen [Leitlinienprogramm Onkologie 2017]. Alle „höherwertigen“ Veränderungen führen auch in dieser Altersklasse zu einer Kolposkopie innerhalb von drei Monaten (III-p, III-g, IIID2) bzw. unverzüglich (IV, V mit jeweils allen Untergruppen).

- Bei Teilnehmerinnen an der Krebsvorsorge, die 35 Jahre oder älter sind, wird eine initiale Co-Testung per zytologischer Untersuchung und HPV-Untersuchung vorgenommen. Bei Befunden der Gruppen I, II-p, II-g und HPV-Negativität werden der Befund als „negativ“ interpretiert und keine Maßnahmen veranlasst. Die nächste Einladung ist dann erst nach einem Zeitintervall von drei Jahren vorgesehen. Bei Befunden der Gruppe IIID1 und HPV-Negativität wird die Co-Testung nach 12 Monaten wiederholt. Gleiches gilt, wenn eine Gruppe I bei einer HPV-positiven Patientin gefunden wird. Alle anderen Konstellationen führen zu einer Kolposkopie innerhalb von drei Monaten (II-p, II-g, IIID1 bei HPV-Positivität; III-p, III-g, IIID2 unabhängig vom HPV-Status) bzw. unverzüglich (IV, V mit jeweils allen Untergruppen, unabhängig vom HPV-Status).

Diese Vorgaben gelten allerdings nur für Leistungen, die im Rahmen der gesetzlichen Krebsvorsorge erbracht werden. Unverändert zu den früheren Vorgaben können gynäkologische Abstriche auch außerhalb der Vorsorgeuntersuchungen als sogenannte „kurative Abstriche“ entnommen werden, z.B. bei aktuellen Beschwerden, in der Schwangerschaftsbetreuung, bei Untersuchungen im Zusammenhang mit einer Empfängnisverhütung oder nach zuvor auffälligen zytologischen Befunden vor Ende 2019 bzw. als Kontrolluntersuchung nach Konisation.

Wenn nun relativ feste Rahmen für die weitere Vorgehensweise zugunsten einer HPV-Testung vorgegeben werden, so müssen diese „zu Lasten“ anderer adjuvanter Untersuchungen wie der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung gehen, die in der Tat offenbar, ersten Erfahrungen am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf und der Pathologie Koblenz folgend, seit Januar 2020 deutlich seltener eingesetzt wird. Dieses Zulasten Gehen gilt dabei unabhängig davon, dass in einer aktuellen Meta-Analyse aus dem Jahr 2019 für die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung eine vergleichbare, in manchen Belangen auch höhere Bedeutung als der HPV-Testung herausgestellt worden war [Peeters et al. 2019].

Als bleibende Indikation könnte man sich Konstellationen vorstellen, bei denen die Abwägung zwischen zwei morphologisch recht ähnlichen Gruppen nach der Münchner Nomenklatur III zu deutlich verschiedenem Vorgehen führen würde. Dann könnte der über die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung zu erhaltende Hinweis, ob bereits eine transformierende HPV-Infektion vorliegen könnte, durchaus von ergänzender Bedeutung sein - es herrscht in der Pathologie ein Konsens darüber, dass der Testausfall im Prinzip nicht die Zuordnung von Zellveränderungen zu einer bestimmten Gruppe nach der Münchner Nomenklatur III verändern darf. Bezogen auf die verschiedenen Altersgruppen ergeben sich folgende Überlegungen:

- Bei Teilnehmerinnen an der Krebsvorsorge, die zwischen 20 und 34 Jahre alt sind und deren Abstrich Zellveränderungen aufweist, welche auf der Grenze zwischen IIID1 und IIID2 liegen, geht es um die Frage „Kolposkopie ja oder nein“ und damit um einen durchaus relevanten klinisch-diagnostischen Abzweig. Hier wäre eine p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung im Einzelfall, insbesondere wenn die Befunder (Zytologie-Assistenten / Fachärzte) keinen Konsens erzielen oder Zweifel bleiben, durchaus sinnvoll. Bei der Frage hingegen, ob eine Veränderung noch III-p, III-g oder IIID2 in Abgrenzung zu einer Gruppe IV ist, liegt keine klare Indikation vor, da ohnehin kolposkopiert werden muss. Bei der langen Zeitachse des biologischen Verlaufes ist dann die Terminvergabe „innerhalb von drei Monaten“ oder „unverzüglich“ (was sicher auch „mehrere Wochen“ bedeuten kann) dann nicht mehr von herzuhebender Bedeutung.
- Bei Teilnehmerinnen an der Krebsvorsorge, die 35 Jahre oder älter sind, besteht im Rahmen der Krebsvorsorge keine klare Option für den Einsatz der p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung mehr. Ist die Teilnehmerin HPV-negativ und zeigt keine Zellveränderungen (Gruppe I), wird auch die Untersuchung im Regelfall kein positives Ergebnis liefern, auch wenn beim HPV-Test nicht alle HPV-Typen abgetestet werden. Ist die Teilnehmerin HPV-positiv und weist dabei keine Zellveränderungen auf (Gruppe I), so wird eine Wiederholung der Co-Testung nach zwölf Monaten als adäquate Maßnahme dafür angesehen, eine nicht-detektierte höhergradige CIN-Läsion nicht auf Dauer zu verpassen. Für HPV-positive Patientinnen ab einer Gruppe II-p und II-g

wiederum ist ohnehin eine Kolposkopie vorzusehen. Allerdings könnte man sicher diskutieren, ob eine p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung bei HPV-positiven Fällen der Gruppe I klinisch sinnvoll ist - die oben in Kapitel 4.3.1. diskutierten Daten verschiedener Studien sprechen im Prinzip dafür.

Zusammenfassend verringert sich somit die Indikationsbreite für die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung durch die neue Richtlinie zur gynäkologischen Krebsvorsorge deutlich, und zwar in erster Linie in Richtung einer prospektiven Identifizierung einer CIN II-Läsion bei Patientinnen unter 35 Jahren mit Zellveränderungen der Wertigkeit eines Überganges zwischen den Gruppen IIID1 und IIID2. Die Indikationsstellung gleicher Art bei Frauen älter als 35 Jahre muss letztendlich als nicht (mehr) gegeben angesehen werden. Ebenso ist die Abklärung HPV-positiver Frauen bei negativem Abstrich oder bei ASCUS [= Gruppe II-p] sowie ganz allgemein von zytologischen LSIL Befunden, wie sie vom Anbieter zur Anwendung in der bisherigen gynäkologischen Krebsvorsorge empfohlen wurde (s. Kapitel 4.1.), nun im Grunde anderweitig gelöst worden.

Außerdem ist es auch dageblieben, dass die Abrechnung der immunzytochemischen Leistungen für die beiden Immunfärbungen sowohl für gesetzlich-versicherte, als auch für privat-versicherte Patientinnen dem Fach Pathologie vorbehalten bleibt, obwohl selbst von Seiten zytologisch tätiger Pathologen anderslautende Vorschläge gemacht worden waren. Die entsprechenden Abrechnungsziffern 19320 (EBM, gesetzlich) bzw. 4815A (GOÄ, privat) sind nämlich in Kapiteln des jeweiligen Regelwerks aufgeführt, die dem Fach Gynäkologie und Geburtshilfe nicht offenstehen. Dies bedeutet, dass somit bei Patientinnen, deren zytologischen Abstriche in gynäkologischen Praxen oder Kliniken beurteilt werden, die p16^{INK4a}/Ki-67-Doppelfärbung nicht durchgeführt bzw. nicht zu Lasten einer Krankenversicherung berechnet werden kann, wenn man das Präparat nicht in ein Institut für Pathologie weiterschicken möchte oder eine Kooperation mit einem solchen Institut besteht.

Insgesamt ist also eine gewisse Skepsis angebracht, was die Zukunft der CINtec[®] PLUS-Untersuchung betrifft - auch wenn man sicher auch manche jetzt verankerte neue Maßnahme der Krebsvorsorge ebenso kritisch sehen könnte.

VII. Literaturverzeichnis

[Akpolat et al. 2004]

I. Akpolat, D. A. Smith, I. Ramzy, M. Chirala, D. R. Mody, *The Utility of p16INK4a and Ki-67 Staining on Cell Blocks Prepared From Residual Thin-Layer Cervicovaginal Material*, *Cancer* (2004), 102, S. 142-149

[Andrae et al. 2008]

B. Andrae, L. Kemetli, P. Sparén, L. Silfverdal, B. Strander, W. Ryd, J. Dillner, S. Törnberg, *Screening-Preventable Cervical Cancer Risks: Evidence From a Nationwide Audit in Sweden*, *J Natl Cancer Inst* (2008),100, S. 622-629

[Arbyn et al. 2008]

M. Arbyn, C. Bergeron, P. Klinkhamer, *Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analyses*, *Obstet Gynecol* (2008), 111, S. 167-177

[Atkins 2011]

K. Atkins, *p16/Ki-67 Dual-Stain Cytology in the Triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou Cytology p16/Ki-67 in Cervical Papanicolaou Tests*, *Cancer Cytopathol* (2011), 119, S. 145-147

[Baltzer 1999]

J. Baltzer, *Diagnostische Verfahren und Therapie der Vor- und Frühstadien*, *Gynäkologie* (1999), Springer Verlag, 32, S. 261-272

[Baltzer et al. 2004]

J. Baltzer, K. Friese, M. Graf, F. Wolff, *Praxis der Gynäkologie und Geburtshilfe, Das komplette Praxiswissen in einem Band*, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag (2004) S. 536f

[Becker et al. 2008]

N. Becker, D. Seidel, C. Stegmaier, H. Ziegler, *Entwicklung von Inzidenz (1970–2003) und Mortalität (1952–2003) an Krebs in Deutschland*, *Onkologie* (2008), Springer Medizin Verlag, 14, S. 276-290

[Bergeron et al. 2015]

C. Bergeron, MD; H. Ikenberg, M. Sideri, K. Denton, J. Bogers, D. Schmidt, F. Alameda, T. Keller, S. Rehm, R. Ridder, and for the PALMS Study Group, *Prospective Evaluation of p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology for Managing Women With Abnormal Papanicolaou Cytology: PALMS Study Results*, *Cancer Cytopathol.* (2015), 123, S. 373-81

[BMG 2012]

https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Downloads/N/Nationaler_Krebsplan/Informationspapier_Nationaler_Krebsplan.pdf

zuletzt abgerufen am 29.05.2017

[Böcking 1990]

A. Böcking, *DNA-Zytometrie und Automatisierung in der klinischen Diagnostik*, *Verh. Dtsch. Ges. Path.* (1990), 74, S. 176-185

[Böcking et al. 1999]

A. Böcking, H. Motherby, *Abklärung zervikaler Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie*, *Pathologie* (1999), Springer Verlag, 20, S. 25-33

[Breitenecker 2009]

G. Breitenecker, *Zervixkarzinom-Screening - Gestern-heute-morgen*, Pathologe (2009), Springer Medizin Verlag, 30, S. 128-135

[Brown et al. 1990]

D. C. Brown, K. C. Gatter, *Monoclonal antibody Ki-67: Its use in histopathology*, Histopathology (1990), 17, S. 489-503

[Bubendorf et al. 2011]

L. Bubendorf, G. E. Feichter, E. C. Obermann, P. Dalquen, *Pathologie - Zytopathologie*, Springer-Verlag (2011)

[Chen et al. 2016]

C.-C. Chen, L.-W. Huang, C.-H. Bai, C.-C. Lee, *Predictive value of p16/Ki-67 immunocytochemistry for triage of women with abnormal Papanicolaou test in cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis*, Ann Saudi Med (2016), 36, S. 245-251

[Cohn et al. 2001]

D. E. Cohn, T. J. Herzog, *New Innovations in Cervical Cancer Screening*, Clinical Obstetrics and Gynecology (2001), 44, S. 538-549

[Conway et al. 2009]

M.J. Conway, C. Meyers, *Replication and Assembly of Human Papillomaviruses*, J Dent Res (2009), 88, S. 307-317

[de Cremoux et al. 2003]

P. de Cremoux, J. Coste, X. Sastre-Garau, M. Thioux, C. Bouillac, S. Labbé, I. Cartier, M. Ziol, A. Dosda, C. Le Galès, V. Molinié, M.-C. Vacher-Lavenu, B. Cochand-Priollet, P. Vielh, and H. Magdelénat, for the French Society of Clinical Cytology Study Group, *Efficiency of the Hybrid Capture 2 HPV DNA Test in Cervical Cancer Screening*, *Am J Clin Pathol* (2003), 120, S. 492-499

[Cuzick et al. 2006]

J. Cuzick, C. Clavel, K.-U. Petry, C. J.L.M. Meijer, H. Hoyer et al., S. Ratnam, A. Szarewski, P. Birembaut, S. Kulasingam, P. Sasieni, T. Iftne, *Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening*, *Int J Cancer* (2006), 119, S. 1095-1101

[Day et al. 2003]

P. M. Day, D. R. Lowy, J. T. Schiller, *Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway*, *Virology*, Vol. 307 (2003), S. 1-11

[DKFZ 2015]

<https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/gebaermutterhalskrebs/frueherkennung.php>

zuletzt abgerufen am 24.10.2020

[Dona et al. 2012]

M. G. Dona, A. Vocaturo, M. Guiliani, L. Ronchetti, F. Rollo, E. Pescarmona, M. Carosi, G. Vocaturo, M. Benevolo, *p16/Ki-67 dual staining in cervical- vaginal cytology: correlation with histology, Human Pappilomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy*, *Gynecol Oncol.* (2012), 126, S. 198-202

[Doorbar 2006]

J. Doorbar, *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*, Clinical Science (2006), 110, S. 525-541

[Eckart 2011]

W. U. Eckart, *Illustrierte Geschichte der Medizin - Von der französischen Revolution bis zur Gegenwart*, Springer-Verlag (2011)

[Evander et al. 1997]

M. Evander, I. A. Frazer, E. Payne, Y. M. Qi, K. Hengst et al., *Identification of the $\alpha 6$ Integrin as a Candidate Receptor for Papillomaviruses*, Journal of Virology, Vol. 71, Nr. 3 (1997), S. 2449-2456

[G-BA 2006]

http://g-ba.de/downloads/40-268-107/2006-12-19_-KFU-HPV-Zervix_TGr.pdf.

zuletzt abgerufen am 24.10.2020

[Gerdes et al. 1983]

J. Gerdes, H. Schwab, H. Lemke, H. Stein, *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*, Int J Cancer (1983), 31, S. 13-20

[Gerdes et al. 1984]

J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab, H. Stein, *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*, J Immunol (1984), 133, S. 1710-1715

[Gertych et al. 2012]

A. Gertych, A. O. Joseph, A. E. Walts, S. Bose, *Automated detection of dual p16/Ki67 nuclear immunoreactivity in liquid-based Pap tests for improved cervical cancer risk stratification*, *Annals Biomed Eng* (2012), 40, S. 1192-1204

[Griesser et al. 2013]

H. Griesser, K. Marquardt, B. Jordan, W. Kühn, K. Neis, H.H. Neumann, R. Bollmann, B. Pöschel, M. Steiner, U. Schenck, *Gynäkologische Zytodiagnostik der Zervix, Müncher Nomenklatur III*, *Frauenarzt* (2013), 54, S. 1042-1048

[Grouven et al. 2007]

U. Grouven, R. Bender, A. Ziegler, S. Lange, *Der Kappa-Koeffizient*, *DMW* (2007), 132, e65-e68

[Hillemanns et al. 1997]

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

[Hillemanns et al. 2007]

P. Hillemanns, G. Mehlhorn, F. Rinnau, P. Soergel, M. W. Beckmann, *HPV-Infektion: Impfung, Diagnostik und Therapie*, *Geburtsh Frauenheilk* (2007), 67, R1-R28

[IDA 2010]

https://www.ag-cpc.de/wp-content/uploads/2018/07/015-027_S2_IDA_Praevension_Diagnostik_und_Therapie_der_HPVI-Infektion_und_praeinvasier_Laesionen_des_weiblichen_Genitale_06-2008_09-2012.pdf

zuletzt abgerufen am 24.10.2020

[Ikenberg et al. 2013]

H. Ikenberg, C. Bergeron, D. Schmidt, H. Griesser, F. Alameda, *Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/ Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study*, Journal National Cancer Institute (2013), Vol. 105, No. 20, S. 1550-1557

[IQWiG 2011]

https://www.iqwig.de/download/S10-01_AB_HP-V-Test_im_Primaerscreening_des_Zervixkarzinoms.pdf

zuletzt abgerufen am 24.10.2020

[Kaufmann et al. 2013]

Prof. Dr. med. M. Kaufmann, Prof. Dr. med. S. Costa, Prof. Dr. med. A. Scharl, *Die Gynäkologie, 3. Auflage*, Springer Medizin Verlag (2013)

[KBV 2015]

http://www.kbv.de/media/sp/Zervix_Zytologie_ab_01.01.2015.pdf

zuletzt abgerufen am 14.10.2016

[KBV 2017]

https://www.kbv.de/media/sp/KBV_Qualitaetsbericht_2017.pdf

zuletzt abgerufen am 24.10.2020

[Khleif et al. 1996]

S. N. Khleif, J. DeGregori, C. L. Yee, *Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity*, Proc Natl Acad Sci USA (1996), 93, S. 4350-4354

[Killeen et al. 2014]

L. Killeen, T. Dye, C. Grace, M. Hiraoka, *Improved Abnormal Pap Smear Triage Using Cervical Cancer Biomarkers*, Journal of Lower Genital Tract Disease (2014), Vol. 18, No. 1, S. 1-7

[Klaes et al. 2001]

R. Klaes, T. Friedrich, D. Spitkovsky, *Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri*, Int J Cancer (2001), 92, S. 276-284

[Kreienberg et al. 2011]

Prof. Dr. med. R. Kreienberg, Prof. Dr. med. H. Ludwig, *125 Jahre Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Werte Wissen Wandel*, Springer Medizin Verlag GmbH (2011)

[Kübler et al. 2014]

K. Kübler, S. Heinenberg, C. Rudlowski, M.-D. Keyver-Paik, A. Abramian, S. Merkelbach-Bruse, R. Büttner, W. Kuhn, H. U. Schildhaus, *c-myc copy number is a powerful prognosticator of disease outcome in cervical dysplasia*, Oncotarget (2014), Vol.6, No.2, S. 825-835

[Kühn 2011]

W. Kühn, *Kolposkopie zur Früherkennung des Zervixkarzinoms*, Pathologe (2011), Springer Verlag, 32, S. 497-504

[Leitlinienprogramm Onkologie 2017]

https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-027OLm_Praevention_Zervixkarzinom_2018-01.pdf

Zuletzt abgerufen am: 31.01.2021

[Lellè et al. 2007]

R. Lellè, A. Cordes, M. Regidor, E. Maier, H. Flenker, *Vergleich Thin-Prep- Dünnschichtzytologie mit der konventionellen zervikalen Exfoliativzytologie in einem Risikokollektiv unter Verwendung der Münchener NomenklaturII*, Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch (2007), 47, S. 81–87

[Mangold und Nauth 2008]

R. Mangold, F. Nauth, *Konisation oder kolposkopisch gesteuerte Portiobiopsie*, Frauenarzt (2008), 49, No. 6, S. 522-527

[Marquardt et al. 2011]

K. Marquardt, H.H. Büttner, U. Broschewitz, M. Barten, V. Schneider, *Persistent carcinoma in cervical cancer screening: non-participation is the most significant cause*. Acta Cytol (2011), 55, S. 433-437

[Mehlhorn et al. 2013]

G. Mehlhorn, E. Obermann, G. Negri, L. Bubendorf, C. Main, M. Koch, H. Sander, B. Simm, M. Lütge, Z. Banrevi, A. Weiss, G. Cathomas, R. Hilfrich, M. W. Beckmann, H. Grisser, *HPV L1 detection discriminates cervical precancer from transient HPV infection: a prospective international multicenter study*, *Modern Pathology* (2013), 26, 967-974

[Muth et al. 2003]

C. Muth, M. Velasco-Garrido, V. Schneider, *Dünnschichtzytologie: Rechtfertigt die Evidenzlage einen breiten Einsatz?*, *Frauenarzt* (2003), 44, S. 421

[Müller 2015]

M. Müller, *Korrelation zytologischer und histologischer Befunde in der Gebärmutterhalskrebsdiagnostik*, Dissertation (2015), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

[Münger 2002]

<https://www.bioscience.org/2002/v7/af/A800/fulltext.htm>

zuletzt abgerufen am 24.10.2020

[Nauth 2014]

H. F. Nauth, *Gynäkologische Zytodiagnostik - Lehrbuch und Atlas*, Georg Thieme Verlag (2014)

[NCI 1989]

NCI, *The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. Developed and approved at the National Cancer Institute Workshop, Bethesda, Maryland, USA, December 12-13*, *Acta Cytol* (1989), 33, S. 567-574

[N.N. 2018]

N.N.: Tragende Gründe zum Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Krebsfrüherkennungs-Richtlinie und eine Änderung der Richtlinie für organisierte Krebsfrüherkennungsprogramme: Programm zur Früherkennung von Zervixkarzinomen.

https://www.ag-cpc.de/wp-content/uploads/2019/12/4-2018-11-22_oKFE-RL_Zervixkarzinom_TrG.pdf

zuletzt abgerufen am 31.01.2021

[N.N. 2019]

N.N.: Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Krebsfrüherkennungs-Richtlinie und eine Änderung der Richtlinie für organisierte Krebsfrüherkennungsprogramme: Programm zur Früherkennung von Zervixkarzinomen.

https://www.ag-cpc.de/wp-content/uploads/2019/12/3-2018-11-22_oKFE-RL_Zervixkarzinom_BAnz.pdf

zuletzt abgerufen am 31.01.2021

[Obermann et al. 2013]

E. Obermann, S. Savic Prince, A. Barascud, B. Grilli, M. Herzog et al., *Prediction of Outcome in Patients With Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions by Fluorescence In Situ Hybridization Analysis of Human Papillomavirus, TERC, and MYC*, *Cancer Cytopathology* (2013), Vol. 121, No.8, S. 423-431

[Ordi et al. 2014]

J. Ordi, A. Sagasta, M. Munmany, L. Rodríguez, A. Torné et al., *Usefulness of p16/ Ki67 Immunostaining in the Traige of Women Referred of Colposcopy*, *Cancer Cythopathology* (2014), S. 227-235

[Östör 1993]

Östör AG, *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review*, Int J Gynecol Pathol (1993) 12 (2), S.186-192

[Papanicolaou 1928]

G. N. Papanicolaou, *New cancer diagnosis*, A Cancer Journal for Clinicians, Vol. 23 (1973), S. 174-179 (zuerst vorgestellt auf einer Konferenz und in diesen Konferenzunterlagen in 1928 publiziert)

[Papanicolaou und Traut 1943]

http://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=An94HiNU22YC&oi=fnd&pg=PA270&dq=Diagnosis+of+Uterine+by+the+Vaginal+Smear+common-wealth+Fund+1943&ots=70Nu8QibkE&sig=jcKrF9s_abqzbH1TrnErTSsRN

zuletzt abgerufen am 31.01.2021

[Peeters et al. 2019]

E. Peeters, N. Wentzensen, C. Bergeron, M. Arbyn, *Meta-Analysis of the accuracy of p16 or p16/Ki-67 immunocytochemistry versus HPV testing for the detection of CIN2+/CIN3+ in triage of women with minor abnormal cytology*, Cancer Cytopathol (2019); 127, S. 169-180

[Petru et al. 2011]

E. Petru, W. Jonat, D. Fink, O. R. Köchli, *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie 3. Auflage*, Springer-Verlag (2011)

[Petry et al. 2011]

K. U. Petry, D. Schmidt, S. Scherbring, A. Luyten, A. Reinecke-Lüthge, C. Bergeron, F. Kommos, T. Löning, J. Ordi, S. Regauer, R. Ridder, *Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology*, *Gynecol Oncol.* (2011), 121, S. 505-509

[Petry et al. 2016]

K. U. Petry, J. T. Cox, K. Johnson, W. Quint, R. Ridder, M. Sideri, T. C. Wright Jr., C. M. Behrens, *Evaluating HPV-negative CIN21 in the ATHENA trial*, *Int. J. Cancer* (2016), 138, S. 2932–2939

[Pettersen et al. 2005]

N. A. Patterson, J. L. Smith, M. A. Ozbun, *Human Papillomavirus Type 31b Infection of Human Keratinocytes Does Not Require Heparan Sulfate*, *Journal of Virology*, Vol. 79, Nr.1 (2005), S. 6838–6847

[Polman et al. 2017]

N. J. Polman, M. H. Uijterwaal, B. I. Witte, J. Berkhof, F. J. van Kemenade, J. W.M. Spruijt, W. M. van Baal, P. G.C.M. Graziosi, D. K.E. van Dijken, R. H.M. Verheijen, T. J.M. Helmerhorst, R. D.M. Steenbergen, D. A.M. Heideman, R. Ridder^{10,11}, P. J.F. Snijders, C. J.L.M. Meijer, *Good performance of p16/ki-67 dual-stained cytology for surveillance of women treated for high-grade CIN*, *Int J Cancer* (2017), 140, S. 423-430

[Prevodnik et al. 2019]

V. K. Prevodnik, T. Jerman, N. Nolde, A. R. Fokter, S. Jezeršek, Z. P. Marinšek, U. Klopčič, S. H. Čelik, K. G. Kramberger, M. P. Žakelj, U. Ivanuš, *Interobserver variability and accuracy of p16/Ki-67 dual immunocytochemical staining on conventional cervical smears*, *Diagnostic Pathology* (2019), 14, S. 48

[Prigenzi et al. 2018]

K. C. K. Prigenzi, T. Heinke, R. C. Salima, G. R. de Azevedo Focchia, *Dual p16 and Ki-67 expression in liquid-based cytological samples compared to Pap cytology findings, biopsies, and HPV testing in cervical cancer screening: A diagnostic accuracy study*, Acta Cytol (2018), 62, S. 104-114

[Reuschenbach et al. 2011]

M. Reuschenbach, S. Vinokurova, M. von Knebel Doeberitz, *HPV-assoziiertes Karzinom des weiblichen Genitaltrakts - Molekulare Mechanismen der Entstehung*, Pathologie (2011), Springer-Verlag, 32, S. 451-460

[Reuschenbach et al. 2012]

Miriam Reuschenbach^{1*}, Mirjam Seiz^{1*}, Christina von Knebel Doeberitz¹, Svetlana Vinokurova¹, Alexander Duwe², Ruediger Ridder², Heike Sartor¹, Friedrich Kommiss³, Dietmar Schmidt³ and Magnus von Knebel Doeberitz, *Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16INK4a and Ki-67 in epithelial cells*, Int. J. Cancer (2012), 130, S. 388–394

[Richards et al. 2005]

M. Richards, R. Lowy, T. Schiller, M. Day, *Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection*, PNAS (2006), Vol. 103, No. 5, S. 1522-1527

[RKI 2018]

<https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/ImpfungenAZ/HPV/HPV.html>

zuletzt abgerufen am 24.10.2020

[Roche 2017]

<https://diagnostics.roche.com/ch/de/products/tests/cintec-plus.html>

zuletzt abgerufen am 24.10.2020

[Sauerbrei et al. 2009]

W. Sauerbrei, M. Blettner, *Interpretation der Ergebnisse von 2x2 Tafeln*, Deutsches Ärzteblatt (2009), Jg. 106, Heft 8, S. 795-800

[Savic et al. 2007]

S. Savic, L. Bubendorf, *Floureszenz- in- situ- Hybridisierung*, Pathologe (2007), Springer Medizin Verlag, 28, S. 384-392

[Schiller 1928]

Dr. W. Schiller, *Über Frühstadien des Portiocarcinoms und ihre Diagnose*, *Archives of Gynecology and Obstetrics* (1928), Vol. 133, S. 211-283

[Schmidt et al. 2011]

D. Schmidt, C. Bergeron, K. J. Denton, R. Ridder, CCSG. European, *P16/ Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study*, *Cancer cytopathol.* (2011), 119, S. 158-166

[Schneider et al. 2008]

A. Schneider, M. von Knebel-Doerberitz, C. Muth, W. Kühn, *Früherkennung des Zervixkarzinoms*, *Onkologe* (2008), Springer Medizin Verlag, 14, S. 147-155

[Schneider 2014]

V. Schneider, *Paradigmenwechsel in der Früherkennung des Zervixkarzinoms?*, *GYNE* (2014), 35, S. 34-41

[Scholzen et al. 2000]

T. Scholzen, J. Gerdes, *The Ki-67 Protein: From the known and the unknown*, J cellular Physiology (2000), 182, S. 311-322

[Siebert et al. 2003]

U. Siebert, C. Muth, G. Scroczyński, M. Velasco-Garrido, A. Gerhardus, B. Gibis, *Dünnschichtpräparation und computergestützte Untersuchungen von Zervixabstrichen im Rahmen der Krebsfrüherkennung. Medizinische Effektivität, gesundheitsökonomische Evaluation und systematische Entscheidungsanalyse*, (Health Technology Assessment): Schriftenreihe des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Informationen im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit und Soziale Sicherung, Bd 35. Asgard-Verlag Sankt Augustin (2003)

[Stoler et al. 2018]

M. H. Stoler, T. C. Wright Jr, A. Ferenczy, J. Ranger-Moore, Q. Fang, M. Kapadia, R. Ridder, *Routine Use of Adjunctive p16 Immunohistochemistry Improves Diagnostic Agreement of Cervical Biopsy Interpretation Results From the CERTAIN Study*, Am J Surg Pathol (2018), 42, S. 1001–1009

[Stoler et al. 2020]

M. H. Stoler, E. Baker, S. Boyle, S. Aslam, R. Ridder, W. K. Huh, T. C. Wright Jr, *Approaches to triage optimization in HPV primary screening: Extended genotyping and p16/Ki-67 dual-stained cytology—Retrospective insights from ATHENA*, Int. J. Cancer (2020), 146, S. 2599–2607

[Tay et al. 2017]

T. K. Y. Tay, K. L. Lim, M. H. Hilmy, A. A. Thike, S. T. Goh, L. H. Song, J. S. G. Hwang, S. Mantoo, *Comparison of the sensitivity and specificity of p16/Ki-67 dual staining and HPV DNA testing of abnormal cervical cytology in the detection of histology*

proven cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and above (CIN 2+), Malaysian J Pathol (2017), 39, S. 257 – 265

[Tjalma 2017]

W. A.A. Tjalma, *Diagnostic performance of dual-staining cytology for cervical cancer screening: A systematic literature review*, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. (2017), S. 275–280

[Trunk et al. 2005]

M. J. Trunk, N. Wentzensen, M. von Knebel Doeberitz, *Molekulare Pathogenese des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen*, Pathologe (2005), Springer Medizin Verlag, 26, S. 283-290

[Uijterwaal et al. 2014]

M. H. Uijterwaal, B. I. Witte, F. J. Van Kemenade, D. Rijkaart, R. Ridder, J. Berkhof, G. A. M. A. Balfourt-van der Meij, M. C. G. Bleeker, P. J. F. Snijders, C. J. L. M. Meijer, *Triaging borderline/mild dyskaryotic Pap cytology with p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: cross-sectional and longitudinal outcome study*, Br J Cancer (2014), 110, S. 1579–1586

[Uijterwaal et al. 2015]

M. H. Uijterwaal, N. J. Polman, B. I. Witte, F. J. van Kemenade, D. Rijkaart, J. Berkhof J, GAMA Balfourt-van der Meij, R. Ridder R, P. J. F. Snijders, C. J. L. M. Meijer, *Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: Baseline and longitudinal data*, Int J Cancer (2015), 136, S. 2361-2368

[Waldstrøm et al. 2013]

Waldstrøm M, Christensen RK, Ørnkov D: *Evaluation of p16 (INK4a)/ Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid- based cytology samples with low- grade squamous intraepithelial lesion*, *Cancer cytopathol.* (2013), 121, S. 136-145

[Wentzensen et al. 2015]

N. Wentzensen, B. Fetterman, E. Castle, M. Schiffman, N. Wood, E. Stiermeran, D. Tokugawa, C. Bodelon, N. Poitras, T. Lorey, W. Kinney, *p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women*, *J Natl Cancer Institute* (2015); 107, S. 1-8

[White et al. 2016]

C. White, S. Bakhiet, M. Bates, H. Keegan, L. Pilkington et al., *Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study*, *Cytopathology* (2016), S. 1-8

[Wilkinson 1990]

E. J. Wilkinson, *Pap Smears and Screening for Cervical Neoplasia*, *Clinical Obstetrics and Gynecology* (1990), 33, S. 817-825

[Wright et al. 2017]

T. C. Wright Jr., C. M. Behrens, J. Ranger-Moore, S. Rehm, A. Sharma, M. H. Stoler, R. Ridder, *Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial*, *Gynecologic Oncology* (2017), 144, S. 51-56

[Yoshida et al. 2011]

T. Yoshida, T. Sano, T. Kanuma, H. Inoue, T. Itoh, C. Yazaki, M. Obara, T. Fukuda, *Usefulness of CINtec® PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer*, *Acta Cytol* (2011), 55, S. 413-420

[Yu et al. 2019]

L. Yu, L. Fei, X. Liu, X. Pi, L. Wang, S. Chen, *Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers*, *J Cancer* (2019), 10, S. 2654-2660

[Zappacosta et al. 2013]

R. Zappacosta, D. Caraceni, L. Ciccocioppo, T. Rotondo, S. Capanna, D. M. P. Gatta, C. D'Angelo, S. Rosini, *Implementing specificity of HPV-DNA primary screening in a successful organised cervical cancer prevention programme*, *Gynecologic Oncology* (2013), S. 427-432

[Ziemke et al. 2014]

P. Ziemke, K. Marquardt, H. Griesser, *Predictive Value of the Combined p16INK4a and Ki-67 Immunocytochemistry in Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions*, *Acta Cytologica* (2014), 58, S. 489-494

[Ziemke und Griesser 2017]

P. Ziemke, H. Griesser, *p16/ Ki-67 in der Zervixzytologie: Indikationen*, *Der Pathologe* (2017), 38, S. 38-44

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben meinen großen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Biesterfeld, meinem Doktorvater und dem ehemaligen Direktor des Instituts für Cythopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die hervorragende Betreuung und die tolle Unterstützung bei dieser Dissertation auch während seiner Tätigkeit aus Koblenz.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Martin Schramm, Oberarzt des Funktionsbereichs Cythopathologie sowie beim gesamten Laborteam, die mich im Rahmen meiner praktischen Labortätigkeiten stets zuverlässig und hilfreich unterstützt haben, sehr bedanken.

Zudem danke ich Herrn Sebastian Ullrich für seine Statistik-Expertise.

Danke an die Medical Research School dafür, dass ich an den sehr hilfreichen *Workshops* teilnehmen durfte.

Für den emotionalen Rückhalt danke ich besonders meinem Mann, unseren beiden kleinen Töchterchen sowie meinen Eltern, die mich während der gesamten Arbeit an der Dissertation durch Ihre Geduld und Ermutigung immer unterstützt haben.