

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. L. Kiesel -

**Bedeutung der Hybrid Capture Methode für die Diagnostik und Therapie von
Vor- und Frühstadien des Zervixkarzinoms**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Cord Rehmsmeier

aus

Bad Oeynhausen

2004

Für meine Eltern

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. R. J. Lellé

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. H. J. Piechota

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. L. Kiesel -
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. J. Lellé
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. H. J. Piechota

Zusammenfassung

Bedeutung der Hybrid Capture Methode für die Diagnostik und Therapie von Vor- und Frühstadien des Zervixkarzinoms

Rehmsmeier, Cord

Humane Papillomaviren (HPV) sind die am häufigsten auf sexuellem Weg übertragenen Viren. Ein vorausgegangener Kontakt mit HPV ist eine notwendige Bedingung für die Entstehung des Zervixkarzinoms. DNA von HPV wird in bis zu 99.7% aller Zervixkarzinome nachgewiesen.

Der Hybrid Capture Test ist ein signalamplifizierendes Hybridisierungssassay zum qualitativen Nachweis von HPV-DNA. Der Stellenwert der Methode wurde an einem Risikokollektiv von 664 Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Münster geprüft. Aus diesem Kollektiv wurden Befunde zu HPV-Prävalenz, Zytologie, Histologie und Immunhistochemie in die Untersuchung eingebracht.

Der Hybrid Capture Test II (HCT II) ist der älteren Methode HCT I mit einer diagnostischen Sensitivität von über 90% in der Erkennung zervikaler Dysplasien eindeutig überlegen. In der Triage von Patientinnen mit unklaren zytologischen Befunden erweist sich HCT II als klinisch wegweisende Methode. Für die PAP-Gruppen IIk und III (ASCUS) werden Sensitivität und Negativer Prädiktiver Wert (NPV) für die Erkennung höhergradiger Dysplasien mit 99.3% bzw. 99.7% berechnet. Schließlich können für den HCT II eine Sensitivität von 94.7% und ein NPV von 94.2% in der Erkennung höhergradiger Dysplasien (HGSIL) und Karzinome berechnet werden. Für die Zytologie werden Sensitivität und NPV mit 86.5% bzw. 87.8% berechnet. Die Daten weisen darauf hin, dass mit einer gleichzeitigen Anwendung von HPV-Test und Zytologie die Ergebnisse der Krebsfrüherkennung verbessert werden könnten.

Die Immunhistochemie ist mit einer Sensitivität von 35.6% und einem NPV von 32.1% als HPV-Nachweisverfahren ungeeignet. Die quantitative Bestimmung von HPV-DNA im Hybrid Capture Test als „Relative Light Units“ (Virusload) eignet sich nicht als Progressionsmarker zervikaler Läsionen.

Die retrospektiv erhobenen Daten deuten auf den großen potentiellen Nutzen der Hybrid Capture Methode in der Krebsfrüherkennung. Für eine endgültige und abschließende Stellungnahme zur Integration des HPV-Tests in die bisherige zytologische Krebsvorsorge müssen jedoch die Ergebnisse der noch offenen prospektiven Studien zum primären HPV-Screening abgewartet werden.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Humane Papillomaviren und Zervixkarzinom.....	1
1.1.1 Historie	1
1.1.2 Molekularbiologie von HPV	3
1.2 Zervixkarzinom - Entstehung und Epidemiologie.....	6
1.2.1 Vor- und Frühstadien des Zervixkarzinoms.....	6
1.2.2 Epidemiologie des Zervixkarzinoms.....	8
1.2.3 Natürlicher Verlauf der HPV-Infektion	10
1.3 HPV-Nachweisverfahren	10
1.3.1 Hybrid Capture Test.....	11
1.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	11
1.4 Fragestellung und Inhalt der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Aufbau der Untersuchung und Patientenkollektiv	14
2.2 Auswahlkriterien.....	16
2.3 Methoden	17
2.3.1 Hybrid Capture Test II	17
2.3.2 Hybrid Capture Test I.....	21
2.3.3 Zytologie nach Papanicolaou	21
2.3.4 Histologie	22
2.3.5 Immunhistochemie	23
2.4 Angaben zur Datenerfassung und Statistik.....	24
2.4.1 Deskriptive Statistik	24
2.4.2 Testverfahren (Induktive Statistik)	24

3 Ergebnisse	25
3.1 Hybrid Capture Test II.....	25
3.1.1 Häufigkeiten der PAP- Abstriche.....	25
3.1.2 HR-HPV positive Befunde (“high-risk”-Sonde B).....	26
3.1.3 „Test gegen den Trend“.....	28
3.1.4 Altersverteilungen zum Hybrid-Capture-Test II	29
3.1.5 Auswertung der Histologien	32
3.1.5.1 Tabellen	32
3.1.5.2 Statistische Analyse zum Hybrid Capture Test II (1).....	39
3.1.5.3 Statistische Analyse zum Hybrid Capture Test II (2).....	40
3.1.5.4 Statistische Analyse zu den PAP-Gruppen IIk und III	41
3.1.5.5 Statistische Analyse zur PAP-Gruppe IIID	42
3.1.5.6 Statistische Analyse der Zytologie	42
3.1.6 Immunhistochemie.....	43
3.1.6.1 Immunhistochemie (IH)	43
3.1.6.2 Hybrid Capture Test II und Immunhistochemie.....	44
3.1.7 Auswertung der „Relative Light Units“ (RLU´s) im HCT II.....	45
3.2 Hybrid Capture Test I	47
3.2.1 Häufigkeiten der PAP-Abstriche.....	47
3.2.2 HR-HPV-positive Befunde („high-risk“-Sonde B).....	48
3.2.3 „Test gegen den Trend“.....	50
3.2.4 Altersverteilungen zum Hybrid Capture Test I	51
3.2.5 Auswertung der Histologien	53
3.2.5.1 Tabellen	53
3.2.5.2 Statistische Analyse zum Hybrid Capture Test I (1).....	58
3.2.5.3 Statistische Analyse zum Hybrid Capture Test I (2).....	59
3.2.5.4 Statistische Analyse der Zytologie	60
3.2.6 Synopsis von HCT I, HCT II und Zytologie.....	61

4 Diskussion..... 63

4.1 Prävalenz von Humanen Papillomaviren (HPV)..... 63

4.2 HPV-Infektion und zervikale Karzinogenese..... 64

4.3 Altersabhängigkeit der HPV-Infektion..... 64

4.4 HPV-Nachweis zur Früherkennung des Zervixkarzinoms..... 65

4.5 Immunhistochemie 72

4.6 Progressionsmarker zervikaler Läsionen..... 72

4.7 Vergleich von Hybrid Capture Test I und II..... 73

4.8 Schlussfolgerung 75

5 Literaturverzeichnis 77

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Humane Papillomaviren und Zervixkarzinom

1.1.1 Historie

Die ersten Berichte über eine mögliche Bedeutung von Humanen Papillomaviren bei der Entstehung des Zervixkarzinoms erschienen in den Jahren 1974 und 1976 durch *zur Hausen et al.* (120;121;128). Sie bezogen sich zu diesem Zeitpunkt auf die Beobachtung einer Koinzidenz von Genitalwarzen und Gebärmutterhalskrebs oder auf die seltene maligne Konversion von Genitalwarzen (*Condylomata acuminata*) und waren letztlich theoretische Überlegungen. 1976 zeigten *Meisels et al.* durch morphologische Untersuchungen, dass Infektionen des Gebärmutterhalses mit HPV regelmäßig auftreten und häufig mit den histologischen Kriterien einer milden Dysplasie assoziiert sind (69;70). Zu Beginn der achtziger Jahre gelang *zur Hausen et al.* der direkte Nachweis neuer HPV-Typen aus Zervixkarzinom-Biopsien (18;35). Die regelmäßige Präsenz von Humanen Papillomaviren, insbesondere HPV 16 und 18, in Zervixkarzinomen führte zu einem gesteigerten Interesse an dieser Virusgruppe und zu einer raschen Expansion des Forschungsgebietes. Im Jahre 1985 konnten *Schwarz et al.* nachweisen, dass HPV-DNA während der zervikalen Karzinogenese regelmäßig in die Wirtszell-DNA eingebaut wird, wobei häufig spezifische Deletionen im Virusgenom auftreten, die vor allem die sog. E2- und L2-Region betreffen. Der wichtigste Befund war, dass zwei Gene des HPV-Genoms, die sog. E6- und E7-Gene, in allen HPV-positiven Zellen aktiviert sind, was eine zentrale Rolle dieser Gene für die Krebsentstehung nahelegte (97).

In den achtziger Jahren wurden weitere Eigenschaften der Humanen Papillomaviren, jetzt als „High-Risk-Typen“ bezeichnet, ermittelt: Humane Papillomaviren können ein breites Spektrum verschiedener menschlicher Zellarten in der Gewebekultur immortalisieren, während nicht-infizierte Zellen nach mehreren Gewebekulturpassagen absterben (68). Werden diese immortalisierten Zellen nach mehrjähriger Kultivierung in immuninkompetente Tiere (Nacktmaus) heterotransplantiert, können diese Zellen spontan ma-

lignes Wachstum entwickeln. Diese Beobachtung belegte das Potential der Hochrisikotypen von HPV, als solitäre Karzinogene wirksam zu werden (124;126).

Weitere neue Aspekte ergaben sich, als *Howley und Harlow* zeigten, dass die HPV-Onkoproteine E6 und E7 – ähnlich wie die Onkoproteine anderer DNA-Tumoviren - spezifische zelluläre Proteine binden und funktionell verändern (37;112). Das E6-Protein bindet das zelluläre p53-Protein, das neben der DNA-Reparatur und Induktion von Apoptose auch die Transkription einer Reihe von weiteren Genen reguliert. Die E6-Bindung führt zu einer funktionellen Inaktivierung und raschen Degradation von p53. E7 bindet dagegen das zelluläre pRb-Protein, das zunächst als Tumorsuppressor beschrieben wurde und eine zentrale Rolle in der Regulation der DNA-Replikation der Zelle spielt. Die E7-Bindung verursacht eine verstärkte Phosphorylierung. Dadurch wird dieses Protein aus seiner Bindung mit dem Transkriptionsfaktor E2F gedrängt, den es zuvor in inaktivem Zustand hält. Die Aktivierung von E2F scheint ein entscheidender Faktor für die Stimulierung des Zellwachstums durch diese Virusinfektion zu sein.

In den letzten zehn Jahren wurde in epidemiologischen und molekularbiologischen Studien eindeutig gezeigt, dass die Infektion mit Humanen Papillomaviren eine notwendige Ursache für die Entstehung eines Zervixkarzinoms ist (14;15;76;91;110;122;125). 1995 kam daher eine Konsensus-Konferenz der International Agency for Research on Cancer (IARC) in Lyon zu dem Schluß: „HPV 16 and HPV 18 are carcinogenic to humans“ (1).

Insgesamt hat sich die Gruppe der Humanen Papillomaviren in den vergangenen Jahren zur komplexesten Entität humanpathogener Erreger entwickelt. Die außerordentliche Heterogenität dieser Virusgruppe war in der Vergangenheit nicht voraussehbar. Gegenwärtig sind über 80 verschiedene Genotypen von HPV kloniert und sequenziert. Die Unterschiede zwischen einzelnen HPV-Genotypen betragen mindestens 10% in der Nukleotidsequenz der am besten konservierten Genregion, die für das Strukturprotein L1 kodiert. Des Weiteren legen Analysen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung sog. degenerierter Primer und anschließender Sequenzanalyse des Amplifikats nahe, dass mindestens 50-70 weitere Genotypen existieren, ohne dass die Ursache dieser Typenvielfalt bekannt ist (127).

1.1.2 Molekularbiologie von HPV

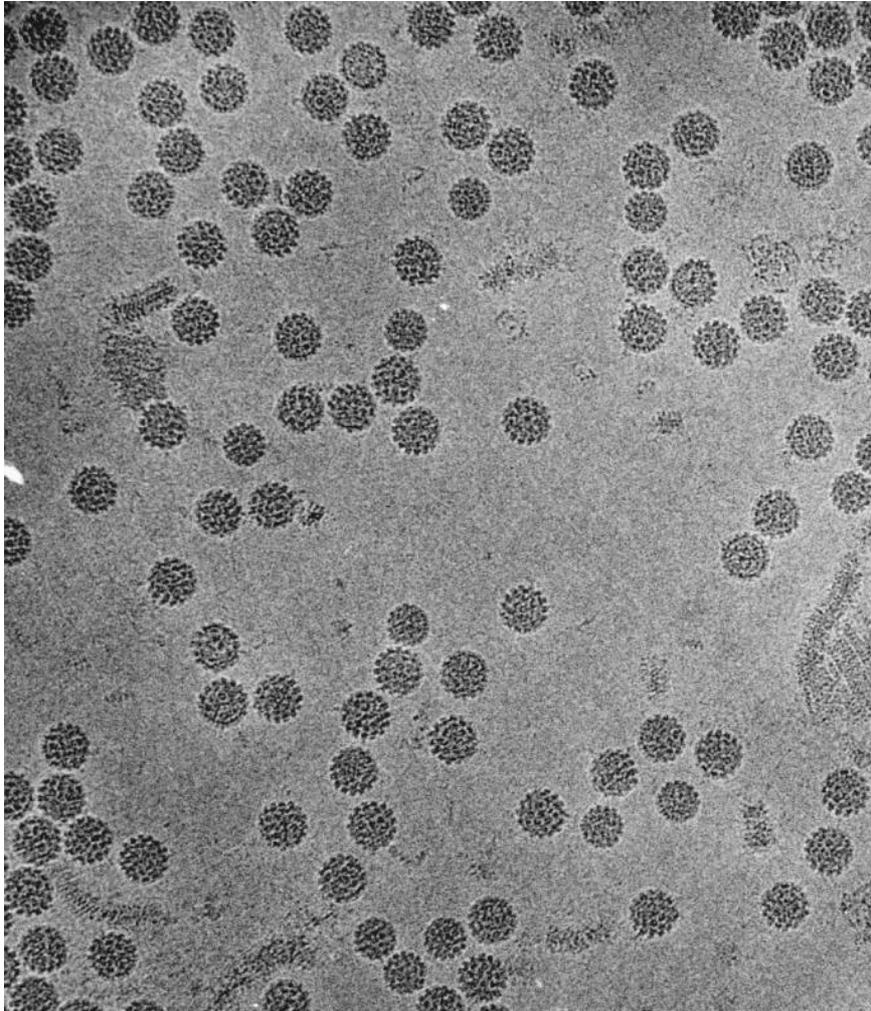


Abb.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV (5)

Humane Papillomaviren enthalten eine doppelsträngige, zirkuläre DNA mit einer Länge von etwa 8.000 Basenpaaren (bp). Das Genom von HPV wird dabei in drei Abschnitte unterteilt: Die „upstream regulatory region“ (URR) enthält rund 400 bp und besteht aus einer Folge von Bindungsstellen für Transkriptions-Aktivatoren und -Suppressoren. Die URR reguliert die Transkription der viralen Gene und kontrolliert die Produktion der HPV-Proteine. Die „early region“ enthält die genetische Information der viralen Onkoproteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7. Die Onkoproteine E6 und E7 haben dabei eine herausragende Bedeutung für die Virus-Replikation und maligne Transformation der Wirtszelle. Das E1-Protein von HPV verfügt über ATPase- und Helicase-Eigenschaften,

während E2 an die URR bindet und die DNA-Transkription aktiviert oder supprimiert. Die Bindung von E4 an das Zytoskelett bewirkt wahrscheinlich den Kollaps des Zytokeratin-Netzwerkes der Wirtszelle. Dieser Vorgang verursacht die charakteristischen histomorphologischen Veränderungen HPV-infizierter Zellen (Koilozyten) und begünstigt die Freisetzung von Viruspartikeln aus den Wirtszellen. Das E5-Protein verstärkt schließlich die EGF-vermittelte Signalübertragung in der Zelle (81;125). Die „late region“ enthält die HPV-Gene L1 und L2. Diese werden im Verlauf der Virusreplikation erst spät transkribiert und kodieren für die HPV-Kapsidproteine.

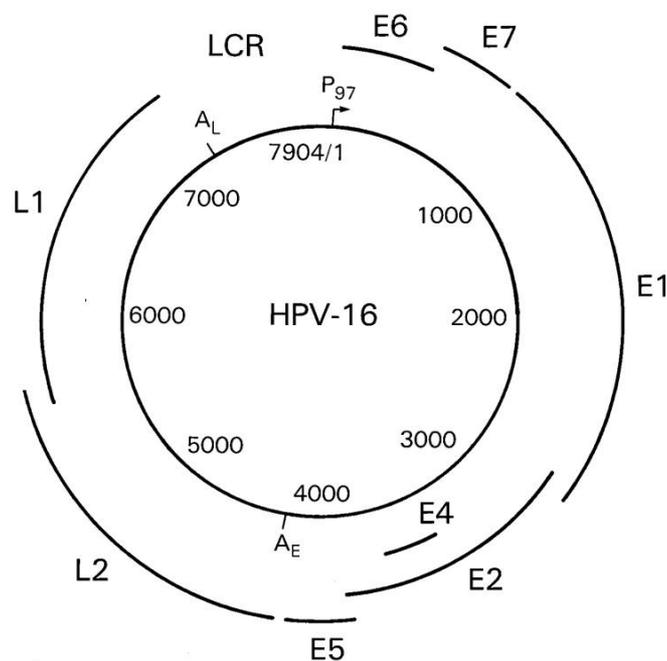


Abb.2: Das zirkuläre Genom von HPV 16 (5)

Der Nachweis von mRNA-Transkripten der Onkoproteine E6 und E7 aus Zellen manifester Zervixkarzinome zeigt, dass die Expression dieser Gene bei der malignen Transformation der Wirtszelle eine zentrale Rolle einnimmt und zur Immortalisierung humaner Keratinozyten beiträgt. Untersuchungen mittels In-situ-Hybridisierung zeigen zudem, dass die Expression von E6 und E7 mit steigendem Schweregrad einer zervikalen Dysplasie (CIN I-III) zunimmt (36).

Das HPV-Onkoprotein E6 beeinflusst den Zellzyklus der Wirtszelle durch eine direkte Wechselwirkung mit p53. P53 ist ein Tumorsuppressor und bewirkt den programmierten Zelltod (Apoptose) sowie einen Zellzyklusarrest in der späten G1-Phase. Den Arrest

der Mitose in der G1-Phase kann die Zelle zur Reparatur von DNA-Schäden nutzen. Die Bindung von E6 führt zur Proteolyse von p53 (81). E6-Proteine aus HR-HPV-Typen besitzen dabei eine höhere Affinität zu p53 als E6-Proteine von LR-HPV-Typen. Die Inaktivierung von p53 durch E6-Bindung beeinträchtigt die Kontrolle des Zellzyklus und begünstigt die Akkumulation genetischer Mutationen. Im Vergleich zu anderen Tumoren, bei denen in der Kanzerogenese häufig Mutationen von p53 auftreten, wird in Zervixkarzinomen das p53 eher durch Proteinbindung inaktiviert.

Das HPV-Onkoprotein E7 bindet den Tumorsuppressor Rb (Retinoblastoma-Protein) und dessen verwandte Proteine p107 und p130 (81;125). Diese Proteine nehmen ebenfalls eine zentrale Rolle im Zellzyklus ein, da sie die DNA-Replikation der Zelle in der S-Phase und die daran beteiligten Proteine regulieren. Bei einer Bindung von E7 an pRb, p107 oder p130 werden diese Kontrollfunktionen beeinträchtigt, es kommt zur unkontrollierten Transkription von Zellzyklus-abhängigen Genen. Das E7-Protein von HPV 6 hat dabei eine geringere Affinität zu pRb als das E7 von HPV 16 und HPV 18. Außerdem wirken E6 und E7 auf den Zellzyklus, indem sie die Bildung von zyklusregulierenden Kinasekomplexen beeinflussen.

Insgesamt wird die Aktivierung der Promotor-Regionen von E6 und E7 durch virus-spezifische Proteine (E2), zelluläre Transkriptionsfaktoren (YY1, AP-1, SP1) und Keratinozyten-spezifische Faktoren (TEF-1, TIF) reguliert (108). Die Bindung dieser Faktoren erfolgt dabei an Akzeptorsequenzen innerhalb der URR. Jede Schädigung der komplexen Regulationsmechanismen durch HPV-Integration oder Deletion von URR-Regionen kann eine unkontrollierte Expression von Onkogenen und die weitere maligne Transformation der Zelle zur Folge haben.

Geringgradige zervikale Dysplasien enthalten HPV-DNA zumeist in zirkulärer, episomaler Form, beim manifesten Zervixkarzinom ist die DNA in etwa 70% der Fälle in das Wirtsgenom integriert (29). HPV-DNA integriert sich dabei immer in der Genregion der E1/E2-Leseraster, was mit einem Funktionsverlust dieser Proteine einhergehen kann. Durch die unkontrollierte Aktivierung zellulärer Gene und Deregulation viraler Onkogene führt die Integration von HPV-DNA in das Wirtsgenom zu einer komplexen zellulären Regulationsstörung und zur malignen Transformation der Wirtszelle.

Molekularbiologische Untersuchungen zeigen weiterhin, dass höhergradige Dysplasien (CIN II-III) mit HR-HPV-Typen assoziiert sind und immer einen monoklonalen Ursprung haben. Leichtgradige Dysplasien (CIN I) sind indessen in 30% der Fälle polyklonalen Ursprungs und korrelieren mit einer Infektion durch LR-HPV-Typen (82).

1.2 Zervixkarzinom - Entstehung und Epidemiologie

1.2.1 Vor- und Frühstadien des Zervixkarzinoms

Am Gebärmutterhals finden sich charakteristische und abgrenzbare Epithelabschnitte: außen das originäre mehrschichtige nicht verhornende Plattenepithel und innen die vom muzinös differenzierten Zylinderepithel ausgekleidete Zervix. Die Zervixschleimhaut kann oberflächlich von Plattenepithel bedeckt sein (11). Die Transformationszone des Zervixepithels, also die Grenze zwischen Platten- und Zylinderepithel, ist dabei Prädiaktionsort der zervikalen Karzinogenese. Histologisch finden sich hier eine vermehrte Mitoseaktivität sowie Zellreifungs- und Differenzierungsvorgänge, die diesen Epithelabschnitt vulnerabel und empfänglich für Infektionen und andere exogene Einflüsse machen. Der größte Anteil der Vor- und Frühstadien des Zervixkarzinoms ist im Bereich der Transformationszone lokalisiert. Von besonderer Bedeutung ist dabei die altersabhängige Lokalisation der Transformationszone: Bei jungen Frauen ist die Grenze von Plattenepithel und Zylinderepithel physiologischerweise an der Zervixoberfläche lokalisiert (Ektopie), während sich diese Grenze bei älteren (peri- oder postmenopausalen) Frauen nach endozervikal verlagert. Demgemäß entstehen bei jungen Frauen die Früh- und Vorstadien eines Zervixkarzinoms eher an der Zervixoberfläche, bei älteren Frauen sind diese endozervikal zu erwarten.

Dysplasien der Zervix werden definiert durch zelluläre und nukleäre Atypien, Veränderungen der Zellstruktur sowie Störungen der Epithelausreifung und des Gewebeaufbaus. 1973 wurde von *Richart* der Begriff der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (cervical intraepithelial neoplasia - CIN) für dysplastische Veränderungen der Zervix geprägt (89). Bei der leichten Dysplasie (CIN I) zeigt das basale Drittel des Epithels eine gesteigerte Proliferation atypischer Zellen, die oberen zwei Drittel sind ausdifferenziert. Sind

zwei Drittel des Epithels durch atypische Zellen ersetzt, liegt eine mäßige Dysplasie (CIN II) vor. Histologisch ist bei CIN I-II mithin noch eine angedeutete Epithelausreifung vorhanden, bei der schweren Dysplasie und dem Carcinoma in situ der Zervix (CIN III) besteht dagegen ein vollständiger Schichtungsverlust des Epithels. Mitosevorgänge finden sich dann nicht nur im Bereich der Basalzellschicht, sondern in allen Epithelschichten, wobei eine Stromainvasion noch nicht nachweisbar ist.

Morphologische Kriterien einer zervikalen HPV-Infektion sind der Nachweis von Koilozyten, Kondylomen, Dyskeratozyten und einer Bi- oder Multinukleation der Plattenepithelien (major changes) sowie Kernvergrößerung, nukleäre Hyperchromasie, Parakeratose, Akanthose und ein makroskopisch nachweisbarer Glykogenmangel des Epithels (minor changes). Der Koilozyt wurde 1956 erstmals von *Koss und Durfee* beschrieben (58) und ist durch eine perinukleäre Zytoplasmaaufhellung und Halo-Bildung charakterisiert. Diese Morphologie entsteht durch einen Kollaps des zytoplasmatischen Zytokeratin-Netzes im Plattenepithel, verursacht durch das E4-Protein von HPV (34). Der Kollaps des Zytokeratins erlaubt die Freisetzung von Viruspartikeln und ist Zeichen einer produktiven Infektion. Dabei besteht eine inverse Korrelation zwischen morphologisch nachweisbaren HPV-bedingten Veränderungen und dem Schweregrad der CIN-Läsion: Je fortgeschrittener die CIN ist, desto seltener werden die genannten major changes beobachtet (44;50).

Zu den Frühstadien des Zervixkarzinoms gehören die frühe Stromainvasion und das sog. Mikrokarzinom, bei denen das maligne Geschehen die Epithelgrenze bereits überschritten hat und in das subepitheliale Gewebe eingedrungen ist. Histologisch finden sich zumeist atypische Plattenepithelausläufer im aufgelockerten subepithelialen Stroma. Typisch ist eine entzündliche Infiltration in der Umgebung der frühinvasiven Herde.

Insgesamt erfolgt die Stadieneinteilung für das Zervixkarzinom nach der FIGO- und der TNM-Klassifikation (28;114) (s. Anhang I).

Histologisch ist das manifeste Zervixkarzinom in den meisten Fällen ein Plattenepithelkarzinom. Eine Untersuchung an über 8.500 invasiven Zervixkarzinomen ergab in 77% der Fälle ein Plattenepithelkarzinom, 11% wurden als Adenokarzinom und 2.5% als adenosquamöses Karzinom identifiziert, die übrigen entfielen auf andere Zelltypen oder unspezifizierte epitheliale Tumoren (96).

Die Zytogenetik manifester Zervixkarzinome zeigt in über 95% der Fälle chromosomale Aberrationen (103). Bei Untersuchungen an Zervixkarzinomen und präneoplastischen Läsionen wurden dabei häufig Aberrationen an den Chromosomen 1 (9;98;115), 3 (22;56;119) und 11 (42) beobachtet. *Atkin et al.* beschrieben zudem Veränderungen der Chromosomen 4, 5, 6, 13, 17, 18 und 21 (10), wobei in frühen Stadien der Karzinogenese der Verlust der Region 5p15 bedeutsam ist, bei maligner Progression zeigen sich häufig Veränderungen der Region 3p13-21. Durch die Untersuchung dieser Bruchpunkte können Gene identifiziert werden, die an der Tumorentstehung beteiligt sind. Zudem deuten Allel-Verluste (LOH) der Chromosomen 9q, 10q und 17p (53), 4q, 5p, 11p und 18p (73) und 1p, 1q, 2q, 3q, 5q, 6p, 6q, 9q, 10q, 11p, 11q, 17p und 17q (104) auf eine Bedeutung dieser chromosomalen Loci in der zervikalen Karzinogenese.

1.2.2 Epidemiologie des Zervixkarzinoms

Gebärmutterhalskrebs steht weltweit an zweiter Stelle der tumorassoziierten Todesursachen bei Frauen, annähernd 350.000 Frauen sterben jährlich an dieser Erkrankung. In Deutschland hat die Mortalität des Zervixkarzinoms in den letzten Jahrzehnten durch neue Behandlungsmethoden und das 1971 eingeführte Gesetzliche Krebsfrüherkennungsprogramm (GKFP) abgenommen (8). Im Vergleich zu anderen europäischen Ländern ist die Mortalitätsrate in Deutschland jedoch hoch. Mit einer standardisierten Mortalitätsrate von 4.4 auf 100.000 Patientinnen lag Deutschland 1993 unter den Ländern mit der höchsten Mortalitätsrate in Westeuropa (2;39). Zwei Prozent der Todesfälle durch Tumorerkrankungen sind bei Frauen in Deutschland durch das Zervixkarzinom bedingt. Die Mortalitätsrate des Zervixkarzinoms liegt in Deutschland höher als in Nachbarländern wie den Niederlanden, Frankreich oder Italien.

Die Inzidenz des Zervixkarzinoms in Deutschland betrug 1997 zwischen 12.0 von 100.000 (altersstandardisiert mit der „BRD-Standardbevölkerung“) im Saarland (4) und 13.6 von 100.000 (altersstandardisiert mit der Europabevölkerung) in Ostdeutschland (6). Deutschland, Norwegen und Dänemark verzeichnen dabei die höchsten Inzidenzraten in Europa. Die Inzidenzraten für Frauen im Alter von 35 bis 64 Jahren lagen 1997 im Saarland bei 18.2 von 100.000 und in Ostdeutschland bei 21.2 von 100.000. Die Zahl der Neuerkrankungen liegt für das invasive Zervixkarzinom bei etwa 7.000 pro

Jahr (2;8;39). Damit hat das Zervixkarzinom einen Anteil von 4 Prozent an allen Krebs-erkrankungen der Frau. Verglichen mit anderen Malignomen ist das mittlere Erkrankungs-
 alter für das Zervixkarzinom mit 54 Jahren relativ niedrig (8). Die Inzidenz von
 Vor- und Frühstadien des Zervixkarzinoms liegt im Vergleich zum manifesten Zervix-
 karzinom um das 100fache höher. In Deutschland beträgt die Inzidenz schwergradiger
 Dysplasien des Gebärmutterhalses etwa 1 Prozent (ca. 300.000 Frauen pro Jahr) (92).

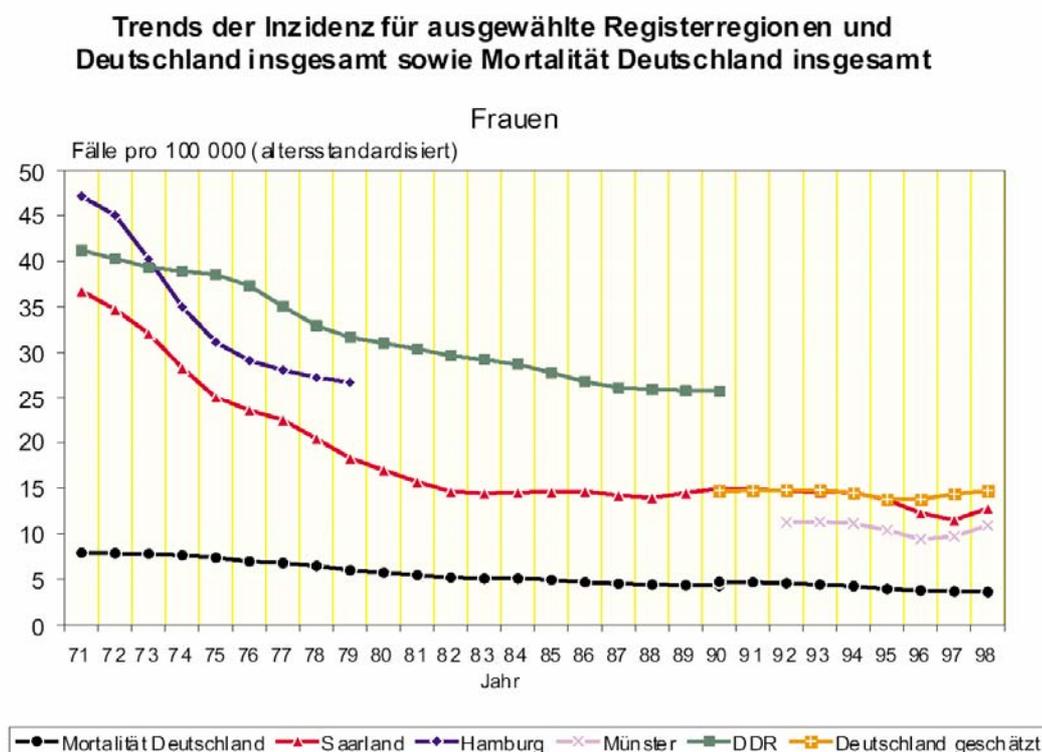


Abb.3: Inzidenz und Mortalität des Zervixkarzinoms in Deutschland (8)

Abbildung 3 zeigt den Verlauf von Inzidenz und Mortalität des Zervixkarzinoms seit der Einführung des Gesetzlichen Krebsvorsorgeprogramms bis zum Jahr 1998. In Deutschland existiert kein landesweites Krebsregister, so dass die Zahl der Neuerkrankungen nur geschätzt werden kann. Das Saarland verfügt über das einzige kontinuierliche Krebsregister in Deutschland. Dort wurde nach Einführung der Vorsorge im Jahr 1971 über 10 Jahre eine deutliche Senkung und nachfolgend eine Stagnation der Inzidenz registriert. Das epidemiologische Krebsregister für den Regierungsbezirk Münster besteht erst seit 10 Jahren, die Registrierung in Hamburg endet 1979.

Neben der Inzidenz werden auch für die Mortalität des Zervixkarzinoms seit Jahren gleichbleibende Zahlen verzeichnet. Die Hauptursache dieser Beobachtung ist der große Anteil von Frauen, die nicht am Vorsorgeprogramm teilnehmen (60). Jede Frau ab dem 20. Lebensjahr kann seit 1982 eine jährliche zytologische Früherkennungsuntersuchung wahrnehmen. Tatsächlich lag der Anteil der teilnehmenden Frauen im Jahr 1997 zwischen 36 und 51 Prozent (3;55). Insbesondere ältere Frauen und Frauen aus niedrigeren sozialen Schichten, die nicht an der Vorsorge teilnehmen, tragen ein hohes Erkrankungsrisiko (33;55).

Von der Etablierung neuer Methoden zur Erhöhung der Sensitivität der Krebsvorsorge profitieren ausschließlich Patientinnen, die bereits am Zervixkarzinom-Screening teilnehmen. Die Senkung der Inzidenz- und Mortalitätszahlen wird dadurch keine durchgreifende Veränderung erfahren, sondern erfordert die ausgedehnte Rekrutierung von Frauen, die bislang nicht an der Vorsorge teilnehmen (60).

1.2.3 Natürlicher Verlauf der HPV-Infektion

Humane Papillomaviren sind die am häufigsten auf sexuellem Wege übertragenen Viren (19). Junge Frauen zeigen eine hohe genitale HPV-Prävalenz, die mit zunehmendem Alter abnimmt (12;20;46;99;113). Die mediane Dauer einer neuerworbenen HPV-Infektion beträgt acht Monate (95% KI: 7-10 Monate), 80% der Infektionen bilden sich spontan zurück (49). 20% der Infektionen persistieren und weniger als 5% der infizierten Frauen entwickeln ein Zervixkarzinom (123). Insbesondere persistierende Infektionen mit Hoch-Risiko-HPV-Typen korrelieren, vor allem bei älteren Frauen, mit der Entwicklung schwergradiger Dysplasien und invasiver Zervixkarzinome (48;49;59;78;111;118).

1.3 HPV-Nachweisverfahren

Unter den verschiedenen Verfahren zum Nachweis Humaner Papillomaviren einschließlich Immunhistochemie, Serologie, Southern-Blot- und Dot-Blot-Hybridisierung sowie In-situ-Hybridisierung eignen sich zur Zeit nur zwei Methoden für den Einsatz in der

Routinediagnostik: der Hybrid Capture Test und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mit diesen Methoden wird die DNA von HPV nachgewiesen. Die Integration von DNA in das Wirtsgenom und die Intensität der E6 / E7-Expression werden nicht erfasst (72).

1.3.1 Hybrid Capture Test

Der Hybrid Capture Test ist ein signalamplifizierendes Hybridisierungsassay zum qualitativen Nachweis der DNA Humaner Papillomaviren und zentraler Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Die genaue Funktionsweise dieses Assays soll daher nachfolgend im Kapitel „Material und Methoden“ erläutert werden (s. Seite 19). Mit einer „Low-Risk“-Sonde und einer „High-Risk“-Sonde kann der Hybrid Capture Test zwei Risikogruppen von HPV nachweisen und unterscheiden. Insgesamt werden 18 genitale HPV-Typen von der neuen Version des Assays (Hybrid Capture II) erfasst. Eine Identifizierung einzelner Virustypen innerhalb der beiden Risikogruppen ist nicht möglich.

1.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Nachweis von HPV-DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) besitzt eine hohe Sensitivität und wurde in einer großen Zahl klinischer und epidemiologischer Studien eingesetzt. Mit Konsensus-Primern werden konservierte Sequenzen des viralen Genoms amplifiziert und anschließend durch typenspezifische Identifikation nachgewiesen. Diese Konsensus-Primer-Systeme ermöglichen die Amplifikation eines weiten Spektrums von HPV-Genotypen. Das effektivste Konsensus-System befindet sich dabei innerhalb der konservierten Regionen des HPV-Genoms, dem L1 „open reading frame“ (ORF). Insgesamt werden degenerierte und nicht-degenerierte Konsensus-Primer-Typen unterschieden.

- Degenerierte Primer sind weniger typenspezifisch und stellen ein Gemisch von Primern dar, deren Sequenzen sich an bestimmten Positionen unterscheiden. Sie können eine große Zahl an HPV-Genotypen amplifizieren.

- Nicht-degenerierte Primer bestehen aus einer definierten Nukleotid-Sequenz, die HPV-typenspezifisch ist. Es treten daher wenige Nicht-Übereinstimmungen bei der DNA-Amplifikation der verschiedenen HPV-Typen auf.

Insbesondere zwei Systeme werden für die HPV-Detektion mittels PCR eingesetzt:

- Die MY09/MY11-Primer, zuerst beschrieben von *Manos et al.* (67).
- Die General Primer GP5/GP6, zuerst beschrieben von *Snijders et al.* (100;109) und modifiziert als GP5+/GP6+ von *Jacobs et al.* (51). Beide Primer amplifizieren eine unterschiedliche Region aus dem L1 ORF von HPV.

Die L1-Konsensus-Primer (MY09/MY11) amplifizieren eine 448-454 Basenpaare lange Region des L1 ORF. Die Primer wurden degeneriert, um die Sequenzvariationen der verschiedenen HPV-Typen zu erfassen. Für den Nachweis des PCR-Produktes durch Southern-Hybridisierung wird ein Gemisch von L1-Fragmenten aus HPV 16, 18, 51 und 56 als generische Probe verwendet, HPV-typenspezifische Proben werden von 23 HPV-Typen und drei unklassifizierten HPV-Typen benutzt. Die Proben werden mit Biotin markiert und die Hybridisierung durch Chemilumineszenz durchgeführt, das Testergebnis kann an Mikrotiterplatten abgelesen werden.

Bei der General Primer-PCR wurde anfänglich der Primer GP5/GP6 mit einer Länge von 20 Nukleotiden eingesetzt. Diese Nukleotide waren homolog zu der korrespondierenden L1 ORF Region der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31 und 33. Die Zielsequenz umfasste eine Region von etwa 140-150 Basenpaaren der verschiedenen HPV-Genome und erlaubte den Nachweis von mindestens 26 verschiedenen HPV-Typen. Klinische Proben, die nach Untersuchung mit dem General Primer HPV-positiv sind, können nochmals mit typenspezifischen Primern amplifiziert werden (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33). Diese Methode wurde modifiziert, indem hochkonservierte Sequenzen in der Nähe des 3'-Endes der GP5- und GP6-Primer mit eingeschlossen wurden (drei Nukleotide für GP5 und fünf Nukleotide für GP6). Durch die Benutzung dieser verlängerten Primer (GP5+/GP6+) können je nach vorliegendem HPV-Typ zwischen 10 und 200 HPV-Kopien nachgewiesen werden.

Zwei Gemische von typenspezifischen Oligonukleotid-Proben werden für die Untersuchung des GP5+/GP6+ PCR-Produktes verwendet, eines für den Nachweis von 14 HR-HPV-Typen und eines für den Nachweis von sechs LR-HPV-Typen.

Im direkten Vergleich liefern die genannten HPV-Nachweismethoden annähernd identische Sensitivitäten für den Nachweis von HPV-DNA. *Peyton et al.* konnten bei der Gegenüberstellung von Hybrid Capture II und MY09/MY11-PCR in über 90% der untersuchten Fälle eine Übereinstimmung in der Detektion von HR-HPV-DNA ermitteln (84), ebenso zeigen GP5+/GP6+ und MY09/MY11 sehr gut vergleichbare Ergebnisse (86).

1.4 Fragestellung und Inhalt der Arbeit

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs durch eine Infektion mit Humanen Papillomaviren. Im Mittelpunkt der Untersuchung steht der Hybrid Capture Test zum Nachweis von HPV-DNA. Die klinische Anwendung und der Stellenwert der Methode wurde an Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Münster geprüft. Im Kapitel „Material und Methoden“ werden der Hybrid Capture Test und das Kollektiv der Patientinnen beschrieben. Das Kapitel „Ergebnisse“ liefert insbesondere Daten zur Validität der Hybrid Capture Methode. Anschließend werden die wichtigsten aus dem Kollektiv erhobenen Daten mit den Ergebnissen anderer Autoren verglichen und diskutiert. Die Bedeutung des Hybrid Capture Test für die Prävention, Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms wird dabei besonders herausgestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbau der Untersuchung und Patientenkollektiv

Zur Untersuchung der Fragestellung, welche Bedeutung der Nachweis von HPV-DNA mit der Hybrid Capture Methode für die Erkennung und Behandlung von Vor- und Frühstadien des Zervixkarzinoms hat, wurden Daten von insgesamt 664 Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Münster analysiert.

Aus diesem Patientenkollektiv wurden folgende Befunde (Zielgrößen) in die Untersuchung eingebracht:

- Zytologie
- HPV- Infektion
- Histologie
- Immunhistochemie

Die Befunde zu Zytologie und HPV-Testung (Hybrid Capture) waren zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits im Zytologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Münster dokumentiert. Die Befunde zu Histologie und Immunhistochemie konnten aus der Datenbank des Instituts für Pathologie der Universität Münster erfaßt werden. Die Art der Untersuchung ist demnach als retrospektiv zu bezeichnen.

Der Zeitraum der Datenerfassung erstreckt sich von März 1997 bis Juli 1999, wobei insgesamt 664 Frauen im Alter von 18 bis 85 Jahren (Durchschnittsalter: 37,6 Jahre) in die Untersuchung Eingang fanden.

Alle erhobenen Befunde zu den angeführten Patientinnen wurden ausschließlich in verschiedenen Sprechstunden der Universitätsfrauenklinik Münster ermittelt:

- Allgemeine Gynäkologische Sprechstunde
- Dysplasie-Sprechstunde
- Endokrinologische Sprechstunde
- Schwangerschaftssprechstunde und Risiko-Schwangerschaftssprechstunde

- Sterilitätssprechstunde

Gemäß den besonderen Problemstellungen, die in diesen Sprechstunden behandelt werden, ergeben die hier untersuchten Frauen ein spezielles Kollektiv, welches nicht mit dem allgemeinen Vorsorgekollektiv verglichen werden kann.

Die einzelnen Sprechstunden werden in der Regel erst dann aufgesucht, wenn (auswärtig) auffällige oder unklare Befunde ermittelt wurden:

- Diagnose einer auffälligen Zytologie der Cervix uteri (Gruppe III nach Papanicolaou und höher)
- eventuell (wiederholter) Nachweis einer HPV-Infektion im unteren Genitalbereich
- Diagnose einer auffälligen Klinik im unteren Genitalbereich (Vulva, Vagina oder Cervix uteri)
- auffällige kolposkopische Untersuchung
- Diagnose einer höhergradigen Zytologie der Cervix uteri im Verlauf einer Schwangerschaft

Des Weiteren werden die einzelnen Sprechstunden von Patientinnen aufgesucht, die sich aufgrund bestimmter Krankheitsbilder in der Betreuung und Nachsorge der Universitätsfrauenklinik befinden:

- Patientinnen nach Behandlung maligner gynäkologischer Tumoren (Operation, Chemotherapie, Bestrahlung)
- Patientinnen mit schweren Infektionskrankheiten und Immunsuppression (HIV und AIDS, Z.n. Organtransplantation)
- Patientinnen mit einer Risikoschwangerschaft durch das Auftreten einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie
- Patientinnen in der Nachsorge von operativen Behandlungen einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie durch Konisation

2.2 Auswahlkriterien

Im Mittelpunkt der Datenerfassung stand die Erkrankung des Gebärmutterhalses im Sinne einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie und die mögliche Assoziation derselben mit einem Befall durch Humane Papillomaviren.

Erstrangiges Einschlußkriterium für die Aufnahme einer Patientin in die Untersuchung war das Vorliegen eines HPV-Befundes aus Untersuchungsmaterial von Portio uteri und/ oder Zervikalkanal.

Als Verfahren zur Testung auf Humane Papillomaviren diente der sogenannte Hybrid-Capture HPV-DNA-Test. Von diesem Test existieren eine ältere und eine neue Version, bezeichnet als Hybrid Capture Test I und II. Die neue Testversion wird an der Universitätsfrauenklinik Münster seit Mai 1998 verwendet, die ältere Testversion wurde vom März 1997 bis Juni 1998 eingesetzt.

Aus der Gesamtzahl der 664 untersuchten Fälle verteilen sich 220 Patientinnen auf den Hybrid Capture Test I und 444 Patientinnen auf den Hybrid Capture Test II.

Zweites Einschlußkriterium war das Vorliegen eines zytologischen Abstriches von Portio uteri und/ oder Zervikalkanal, dessen Ergebnis in sinnvollem zeitlichen Zusammenhang mit dem Befund des HPV-Tests stehen mußte. In der Regel erfolgte die Materialentnahme bei der Patientin für beide Methoden innerhalb derselben gynäkologischen oder kolposkopischen Untersuchung.

Bei entsprechender Indikation wurde in diagnostischer oder therapeutischer Absicht Gewebe von Portio uteri und/ oder Zervikalkanal entnommen. Die Befunde dieser histologischen Präparate wurden in die Datenanalyse aufgenommen.

An einem Teil der histologischen Präparate waren immunhistochemische Färbungen angefertigt worden, deren Ergebnisse ebenfalls in die Untersuchung einbezogen wurden.

Nicht in die Untersuchung aufgenommen wurden Daten, für deren Bestimmung Material von Vulva, Vagina oder Fornix vaginae entnommen wurde.

2.3 Methoden

2.3.1 Hybrid Capture Test II

Der dieser Untersuchung zugrundeliegende HPV-DNA-Test basiert auf der Hybrid Capture Methode, die von der Firma Digene Diagnostics (Digene Corporation, 1201 Clopper Road, Gaithersburg, MD 20878, USA) entwickelt wurde.

Es handelt sich dabei um ein signalamplifizierendes Hybridisierungssassay zum qualitativen Nachweis der DNA Humaner Papillomaviren.

Das Assay kann dabei zwei HPV-Gruppen nachweisen und unterscheiden: Mittels einer „low-risk“-Sonde die HPV-Typen 6/ 11/ 42/ 43/ 44 und mittels einer „high-risk“-Sonde die HPV-Typen 16/ 18/ 31/ 33/ 35/ 39/ 45/ 51/ 52/ 56/ 58/ 59/ 68.

Insgesamt werden 18 HPV-Typen mit diesem Testverfahren erfasst – eine Identifizierung einzelner Virustypen innerhalb der beiden Gruppen ist nicht möglich.

Materialgewinnung

Zur Gewinnung des Probenmaterials wird während der gynäkologischen oder kolposkopischen Untersuchung ein spezielles, konusförmig zulaufendes Bürstchen verwendet, der sog. Digene Cervical Sampler.

Nach Reinigung des äußeren Muttermundes wird diese Bürste etwa 1-1,5 cm in den Muttermund eingeführt, bis die größten Borsten die Ektozervix berühren. Danach wird die Bürste dreimal entgegen dem Uhrzeigersinn gedreht und wieder aus dem Zervikalkanal entfernt. In einem Röhrchen mit Transportmedium kann die Bürste schließlich zur weiteren Verarbeitung versandt werden.

Testablauf (s. Anhang II)

Im Zytologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Münster steht die komplette Ausstattung für die Durchführung der Hybrid Capture Methode zur Verfügung.

Im ersten Schritt des Testprotokolls erfolgt die Denaturierung der von Portio uteri und Zervikalkanal abgestrichenen Zellen mittels verdünnter NaOH-Lösung.

Die aus den Zellen freigesetzte DNA wird dann mit spezifischen HPV-RNA-Sonden hybridisiert. Hierbei enthält die HPV-Sonde A die Gruppe der „low-risk“-Viren (HPV 6/ 11/ 42/ 43/ 44), die HPV-Sonde B die Gruppe der „high-risk“-Viren (HPV 16/ 18/ 31/ 33/ 35/ 39/ 45/ 51/ 52/ 56/ 58/ 59/ 68). In diesem zweiten Schritt entstehen mithilfe DNA / RNA-Hybride, wenn die untersuchten Zellen HPV-DNA-Zielsequenzen enthalten.

Die nächste Phase beinhaltet den Capture-Schritt des Hybrid-Capture-Protokolls, denn jetzt werden die hergestellten DNA / RNA-Hybride an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. Jede Vertiefung dieser Mikrotiterplatte enthält an ihrer Innenseite anti-RNA / DNA-Antikörper, auf denen die Hybride immobilisiert werden.

Im Anschluß an den Capture-Schritt werden Antikörper in die Mikrotitervertiefungen eingebracht, die mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert sind und ebenso wie die stationären Antikörper spezifisch für DNA / RNA-Hybride sind.

Zuletzt erfolgt die eigentliche Nachweisreaktion mittels Chemolumineszenz. Ein spezielles Reagenz dient als Substrat der Alkalischen Phosphatase, bei der folgenden enzymatischen Reaktion wird Licht emittiert.

Eine Amplifikation des Lichtsignals wird dadurch erreicht, daß jeder Antikörper der flüssigen Phase mit mehreren Molekülen AP konjugiert ist und viele Antikörper an jedes immobilisierte Hybrid binden.

Die Lichtemission wird in einem Luminometer gemessen und in „Relative Light Units“ (RLU) angegeben. Das Ausmaß der gemessenen Lichtemission zeigt an, ob das Material des Zellabstriches HPV-DNA-Sequenzen enthielt.

Qualitätskontrolle (Validierung)

Bei jedem Assay werden neben den Patientenproben jeweils drei Positivkontrollen und drei Negativkontrollen getestet.

Die Positivkontrolle für die Sonde A enthält 1,0 pg/ml HPV 11-DNA, die Positivkontrolle für die Sonde B enthält 1,0 pg/ml HPV 16-DNA, jeweils in Transportmedium mit Träger-DNA. 1,0 pg/ml HPV-DNA entspricht etwa 5000 HPV-Genomen/ml.

Die Negativkontrollen enthalten hingegen nur Träger-DNA in Probentransportmedium.

- Die Werte der Kontrollansätze dürfen einen Variationskoeffizienten (%CV) von 25% nicht überschreiten. Liegt der Variationskoeffizient >25%, wird derjenige Kontrollwert verworfen, der am weitesten vom Durchschnittswert entfernt ist. Mit den verbleibenden zwei Kontrollwerten wird der %CV erneut berechnet. Liegt die Differenz zwischen den beiden Einzelwerten und dem Durchschnittswert unter 25%, kann der Test fortgesetzt werden. Überschreitet die Differenz den Koeffizienten, wird der Testansatz ungültig.
- Der Durchschnittswert der Negativkontrollen darf 250 RLU nicht überschreiten. Liegt der Wert darüber, wird der Testansatz ungültig.
- Die Durchschnittswerte der Positivkontrollen (PCx) und der Negativkontrollen (NCx) liefern den PCx/ NCx-Quotienten.

Der Testansatz ist dann gültig, wenn der PCx/ NCx-Quotient $\geq 2,0$ ist:

Testvalidierung/ Akzeptable Bereiche
$PCA/ NCA \geq 2,0$
$PCB/ NCB \geq 2,0$

Berechnung des Grenzwertes

Ist der Testansatz gültig, kann der Grenzwert zur Ermittlung der positiven Patientenproben berechnet werden. Beispielrechnung für die HR-HPV-Sonde B:

	NC RLU Werte	PCB RLU Werte
	97	312
	101	335
	91	307
Durchschnittswert	96	318
% CV	4,9	4,7
PCBx/ NCx	NA	3,31

Der positive Cut off für Sonde B (PCBx) ist hier 318, sämtliche RLU-Werte der Patientenproben werden zu diesem Grenzwert ins Verhältnis gesetzt.

Interpretation der Ergebnisse

- Patientenproben mit einem RLU/ PCAx-Quotienten $\geq 1,0$ für die HPV-Sonde A sind „positiv“ für einen oder mehrere der HPV-Typen 6/ 11/ 42/ 43 oder 44.
- Patientenproben mit einem RLU/ PCBx-Quotienten $\geq 1,0$ für die HPV- Sonde B werden als „positiv“ für einen oder mehrere der HPV-Typen 16/ 18/ 31/ 33/ 35/ 38/ 45/ 51/ 52/ 56/ 58/ 59 oder 68 gewertet.
- Patientenproben mit einem RLU/ PCx-Quotienten $<1,0$ werden als „negativ“ oder „nicht nachweisbar“ für die 18 getesteten HPV-Typen interpretiert. Entweder sind keine HPV-DNA-Sequenzen vorhanden oder die HPV-DNA-Menge liegt unterhalb der Nachweisgrenze des Tests.
- Wenn der RLU/ PCx-Quotient einer Probe nahe an 1,0 liegt und eine HPV-Infektion vermutet wird, sollten alternative Testverfahren oder eine Probenwiederholung durchgeführt werden.

2.3.2 Hybrid Capture Test I

Der Hybrid Capture Test I der Fa. Digene Diagnostics arbeitet nach den gleichen Testprinzipien wie der Hybrid Capture Test II (s. Abschnitt 2.3.1).

Die Vorgängerversion I zeigt zwei wesentliche Unterschiede in der Detektion von DNA Humaner Papillomaviren:

1. Die analytische Sensitivität des Tests ist um das Zehnfache geringer als beim Hybrid Capture Test II. Die Nachweisgrenze von HPV-DNA liegt bei 10,0 pg DNA/ml, das entspricht etwa 50.000 HPV-Genomen/ml.
Beim Hybrid Capture Test II liegt diese Grenze bei 1,0 pg DNA/ml, die Nachweisgrenze sinkt im Testansatz auf etwa 5.000 HPV-Genome/ml.
2. Die „high-risk“-Sonde B des Hybrid Capture Test I erkennt 9 verschiedene Virustypen, HPV 39/ 58/ 59/ 68 sind im Gegensatz zu Hybrid Capture II nicht enthalten.
Hybrid Capture I erfasst demnach insgesamt 14 HPV-Typen, wobei die „low-risk“-Typen identisch mit Hybrid Capture II sind.

2.3.3 Zytologie nach Papanicolaou

Das Material der zytologischen Abstriche von Portio uteri und Zervikalkanal wurde unmittelbar nach der Entnahme in feuchtem Zustand fixiert. Die weitere Verarbeitung und endgültige Bewertung des Abstrichmaterials erfolgte im Zytologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Münster.

Für die Färbung der Präparate kam die laborübliche Methode nach Papanicolaou (siehe Anhang III) zur Anwendung.

Als Grundlage zur mikroskopischen Bewertung der hergestellten zytologischen Präparate diente die in Deutschland etablierte Münchener Nomenklatur II für gynäkologische Zytodiagnostik (siehe Anhang IV).

In der vorliegenden Arbeit findet zusätzlich die PAP-Gruppe Iik Verwendung, die in der offiziellen Nomenklatur nicht aufgeführt ist. Der zytologische Befund PAP Iik stellt einen Abstrich unklarer Dignität dar. Aufgrund entzündlicher oder degenerativer Veränderungen ist die eindeutige Bewertung und Einordnung des Zellbildes nicht möglich.

2.3.4 Histologie

Bei 286 Patientinnen wurde im Rahmen kolposkopischer Untersuchungen oder operativer Eingriffe Gewebematerial von Portio uteri und Zervikalkanal gewonnen.

Ergebnisse von 194 Histologien konnten dabei in die Datenanalyse des Hybrid Capture Test II, Ergebnisse von 92 Histologien in die Datenanalyse des Hybrid Capture Test I einbezogen werden.

Als Entnahmemethoden kamen dabei Probeexzision (PE), Konisation (K), Endocervikale Curretage (ECC), Zervixabrasio (Cabr), Curretage (Cur) und Hysterektomie (HE) zur Anwendung. In den Abschnitten 3.1.5 und 3.2.5 des Ergebnisteils werden die in Klammern gesetzten Abkürzungen für diese Prozeduren verwendet.

Die Herstellung, Aufarbeitung und Bewertung der histologischen Präparate erfolgte im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Münster.

- Fixierung des Materials über 24 Stunden in gepuffertem Formalin
- Zuschneiden des Materials und Einbettung in Paraffin
- Anfertigung von 2µm dünnen Schnitten aus den Paraffinblöcken
- Färbung der Präparate in Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung)

Die mikroskopische Bewertung der Präparate (Dysplasiegrad) erfolgte je nach histopathologischem Befund anhand der Histologischen Klassifikation für zervikale intraepitheliale Neoplasien / Tumoren des weiblichen Genitaltraktes (WHO 1994).

CIN I	Leichte Dysplasie
CIN II	Mittelgradige Dysplasie
CIN III	Schwere Dysplasie und Carcinoma in situ (CIS)

Sämtliche Nachweise von mikroinvasiven Karzinomen (mivCa, TNM- Stadium T1a1/T1a2), Plattenepithelkarzinomen (PE-Ca) sowie Adenokarzinomen (Ad-Ca) wurden ebenfalls in die Datenanalyse aufgenommen.

2.3.5 Immunhistochemie

In die Datenanalyse zum Hybrid Capture Test II (Mai 1998 bis Juli 1999) konnten insgesamt 194 histologische Befunde eingebracht werden. An 79 dieser 194 histologischen Präparate wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen zum HPV-Nachweis durchgeführt.

Nach Autoklavenvorbehandlung diente hierbei die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Methode) zur Detektion von HPV-Hüllproteinen (Antikörper gegen das L1-Kapsidprotein, Fa. DAKO Diagnostika / Hamburg).

2.4 Angaben zur Datenerfassung und Statistik

2.4.1 Deskriptive Statistik

Die Erfassung und Ordnung der erhobenen Daten sowie die Darstellung in Tabellen und Diagrammen wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm „Excel“ (Microsoft) durchgeführt.

Für die statistische Analyse und Auswertung der Daten wurden im Ergebnisteil wesentliche Zusammenhänge in Kontingenztafeln (Vierfeldertafeln) dargestellt sowie wichtige Kenngrößen und Maßzahlen berechnet:

- absolute und relative Häufigkeitsverteilungen
- Altersverteilungen
- Statistische Maßzahlen (Sensitivität, Spezifität, Positiver Prädiktiver Wert, Negativer Prädiktiver Wert) und deren Konfidenzintervalle

2.4.2 Testverfahren (Induktive Statistik)

In den Abschnitten 3.1.3 und 3.2.3 des Ergebnisteils kommt als statistisches Verfahren der „Test gegen den Trend“ zur Anwendung (aus: Pfanzagl J., Allgemeine Methodenlehre der Statistik II, Sammlung Götschen, Band 747 / 747a, Berlin 1978).

Zur Berechnung von Signifikanzniveaus werden in der vorliegenden Untersuchung der Chi-Quadrat-Test nach Pearson sowie der Exakte Test nach Fisher angewandt.

Die Berechnung von Statistischen Maßzahlen, Signifikanzen und Konfidenzintervallen erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11th floor, Chicago, Illinois 60606).

3 Ergebnisse

3.1 Hybrid Capture Test II

Der nachfolgende Abschnitt 3.1 beschreibt die an insgesamt 444 Patientinnen im Zeitraum von Mai 1998 bis Juli 1999 erhobenen Befunde. Während dieses Zeitraumes kam im Zytologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Münster als HPV-Nachweisverfahren die Hybrid Capture II-Methode zur Anwendung.

3.1.1 Häufigkeiten der PAP- Abstriche

Tab. 3-1 und Abb. 3-1 zeigen die Häufigkeitsverteilungen der Abstriche nach Papanicolaou in dem o.a. Kollektiv von 444 Patientinnen. Die Materialentnahme für PAP-Abstrich und konsekutive HPV-Testung erfolgte im Rahmen derselben gynäkologischen Untersuchung.

Mit einer relativen Häufigkeit von 43,7% ist der Anteil der PAP-Gruppe II (Klassifikation der zytologischen Befunde nach der Münchener Nomenklatur II, s. Anhang IV) am größten.

Der Anteil unklarer zytologischer Befunde (PAP-Gruppen IIk und III) beträgt 19,8%.

Abstriche mit Zellen einer schweren Dysplasie oder Zellen eines malignen Tumors haben bei den untersuchten Patientinnen einen Anteil von 13,3% (PAP IVA, IVB, V).

PAP- Gruppe	Anzahl	Relative Häufigkeit (%)
0	2	0,5
I	9	2
II	194	43,7
II k	69	15,5
III	19	4,3
III D	92	20,7
IV A	44	9,9
IV B	2	0,5
V	13	2,9
	444	100

Tab. 3-1: Absolute und relative Häufigkeiten der PAP- Gruppen

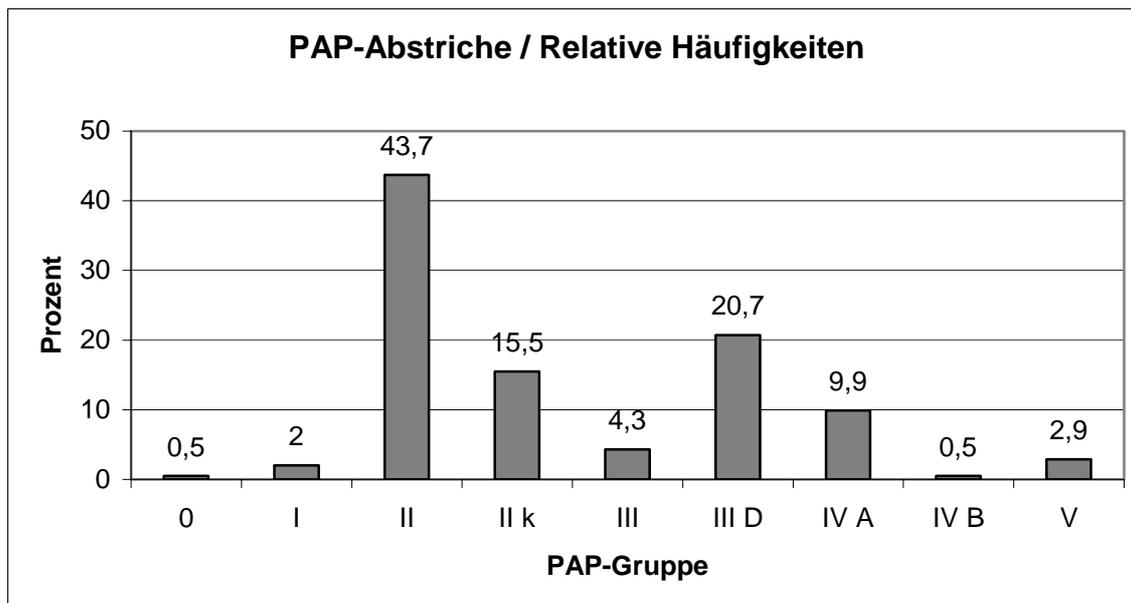


Abb. 3-1: Darstellung der relativen Häufigkeiten

3.1.2 HR-HPV positive Befunde (“high-risk”-Sonde B)

Tab. 3-2 und Abb. 3-2 beschreiben die mit der HCT II-Methode im genannten Patientenkollektiv erhobenen Häufigkeitsverteilungen von HR-HPV-positiven Befunden in Korrelation zu den unter 3.1.1 angeführten PAP-Befunden.

182 von 444 untersuchten Patientinnen haben dabei einen Nachweis von HR-HPV. Das entspricht einem Anteil von 41% (Prävalenz bei negativer Zytologie: 12%).

PAP- Gruppe	Anzahl	PAP rel. Hfkt. (%)	Sonde B positiv	Sonde B positiv rel. Hfkt. (%)
0	2	0,5	2	100
I	9	2	1	11
II	194	43,7	31	16
II k	69	15,5	20	29
III	19	4,3	9	47
III D	92	20,7	66	72
IV A	44	9,9	41	93
IV B	2	0,5	2	100
V	13	2,9	10	77
	444	100	182	

Tab. 3-2: Absolute und relative Häufigkeiten für die “high-risk”-Sonde B

Aus der grafischen Darstellung in Abb. 3-2 ist ersichtlich, dass die relative Häufigkeit des HR-HPV-Nachweises über die einzelnen PAP-Gruppen zunimmt.

Bei zytologischem Nachweis von Zellen einer schweren Dysplasie (PAP IVA und IVB) läßt sich in 93 bzw. 100% der Fälle HR-HPV-DNA mittels HCT II nachweisen.

Beim zytologischen Nachweis von Karzinomzellen (PAP V) sinkt der Anteil von HR-HPV-DNA in den vorliegenden Daten auf 77%.

Bei den unklaren zytologischen Diagnosen PAP IIk und III kann in 29 bzw. 47% der HC II-Testungen HR-HPV-DNA nachgewiesen werden.

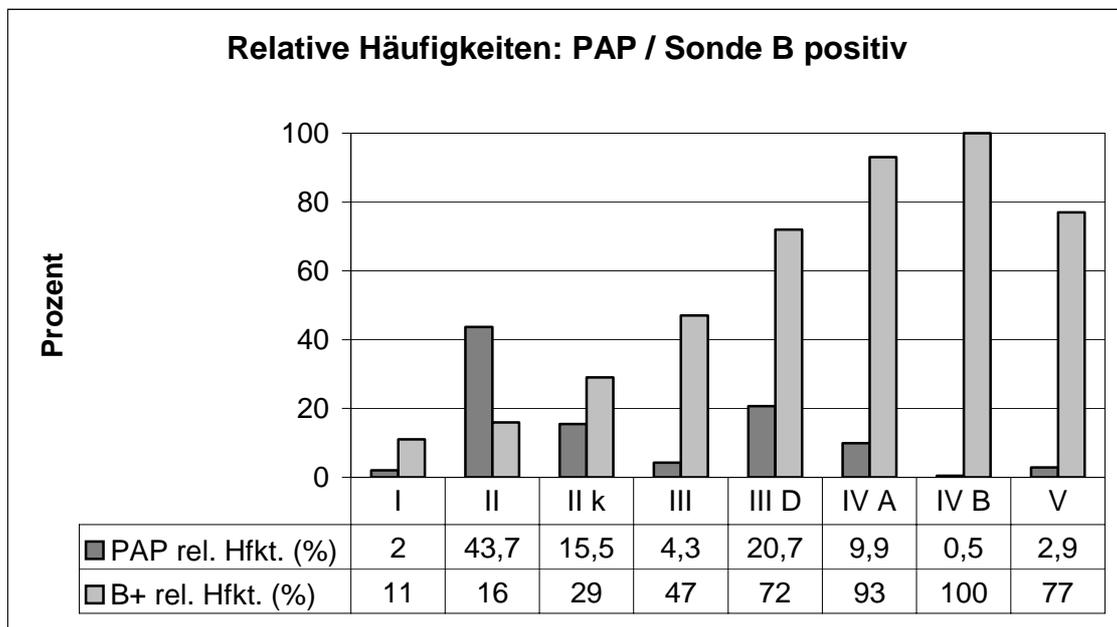


Abb. 3-2: Darstellung der relativen Häufigkeiten für PAP-Gruppen und Sonde B

3.1.3 „Test gegen den Trend“

Zur statistischen Analyse der in Abschnitt 3.1.2 dargestellten Beziehung zwischen Zytologie (PAP-Gruppe) und HC II-Test (Nachweis von HR-HPV) wurde der „Test gegen den Trend“ eingesetzt.

Die Nullhypothese bei diesem Test ist das Fehlen eines Trends (einer Beziehung) zwischen PAP-Gruppe und HR-HPV-Positivität.

Die ermittelte Prüfgröße T ist hierbei deutlich positiv und beträgt 12,1.

Damit besteht ein hochsignifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$, Quantile der Normalverteilung) zwischen Dysplasiegrad (PAP-Gruppe) und Nachweis von HR-HPV mittels HCT II.

PAP- Gruppe	i (Nr. der Gruppe)	B+ (ni1)	B - (ni2)	Anzahl (ni)	i*ni1	i*ni	i2*ni
I	1	1	8	9	1	9	9
II	2	31	163	194	62	388	776
II k	3	20	49	69	60	207	621
III	4	9	10	19	36	76	304
III D	5	66	26	92	330	460	2300
IV A	6	41	3	44	246	264	1584
IV B	7	2	0	2	14	14	98
V	8	10	3	13	80	104	832
		180	262	442	829	1522	6524

Tab. 3-3: Test gegen den Trend

$$T = \frac{n \sum_{i=1}^r in_{i1} - n_g \sum_{i=1}^r in_{ig}}{\sqrt{\frac{n_g n_g^2}{n-1} (n \sum_{i=1}^r i^2 n_{ig} - (\sum_{i=1}^r in_{ig})^2)}} \quad (\text{Grundformel für Prüfgröße T})$$

$$T = \frac{444 \cdot 829 - 180 \cdot 1522}{\sqrt{\frac{180 \cdot 262}{441} (442 \cdot 6524 - (1522)^2)}} = \frac{94116}{\sqrt{106,9 \cdot 567124}} = \frac{94116}{7786,2} = 12,1$$

3.1.4 Altersverteilungen zum Hybrid-Capture-Test II (HR-HPV-positive Befunde)

Bei 182 von insgesamt 444 Patientinnen konnte mit der HCT II-Methode ein positiver Nachweis für HR-HPV geführt werden, das entspricht einem Anteil von 41%.

Tab. 3-4 und Abb. 3-3 zeigen die Verteilung der HR-HPV-positiven Befunde auf verschiedene Altersgruppen des untersuchten Patientenkollektivs.

In der Altersgruppe der Frauen von 30-34 Jahren findet sich die größte Anzahl HR-HPV-positiver Befunde mit einem relativen Anteil von 31% (n= 57).

Ab dem 65. Lebensjahr findet sich in den vorliegenden Daten ein einzelner HR-HPV-positiver Befund in der Gruppe der 80-84jährigen Frauen.

Altersgruppe (Jahren)	HCT II (HR-HPV-positiv)	HCT II (Patienten gesamt)
15 - 19	1	7
20 - 24	16	32
25 - 29	40	80
30 - 34	57	105
35 - 39	37	86
40 - 44	13	51
45 - 49	7	27
50 - 54	1	9
55 - 59	5	15
60 - 64	4	14
65 - 69	0	3
70 - 74	0	4
75 - 79	0	6
80 - 84	1	3
85 - 89	0	2
Summe	182	444

Tab. 3-4: Absolute Häufigkeiten HR-HPV-positiver Befunde in verschiedenen Altersgruppen

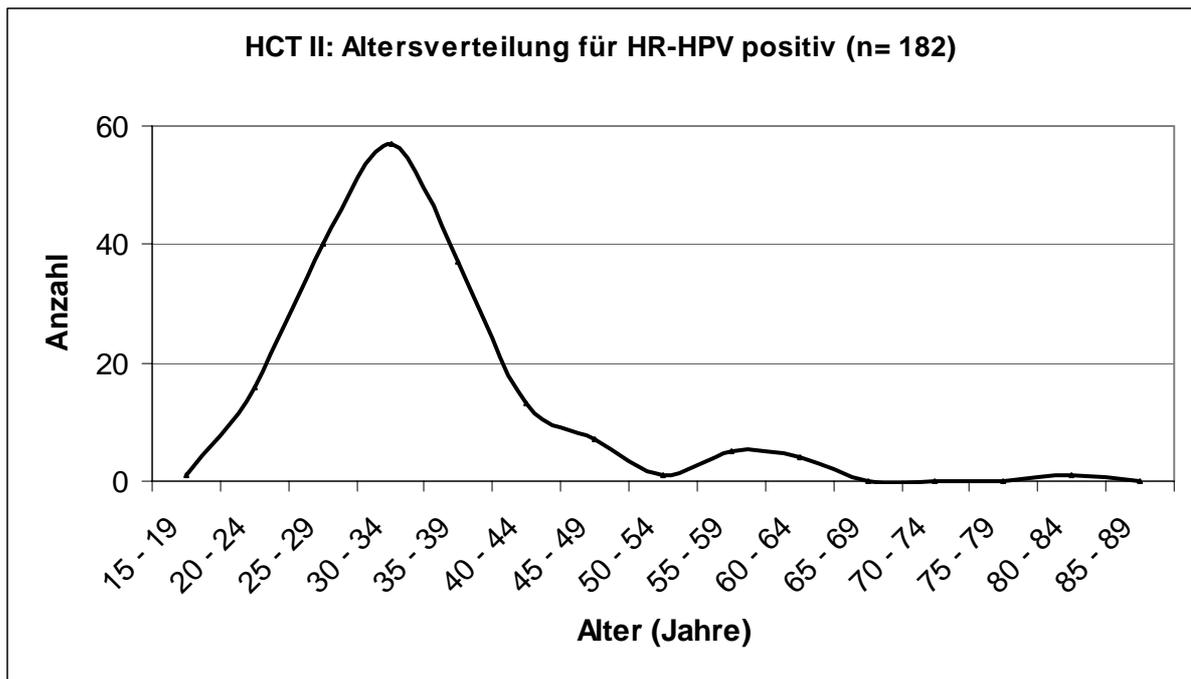


Abb. 3-3: Grafische Darstellung der Altersverteilung

Tab. 3-5 und Abb. 3-4 zeigen eine Aufteilung aller Patientinnen in zwei Altersgruppen (≤ 30 Jahre bzw. > 30 Jahre) sowie die absoluten und relativen Häufigkeiten der zugehörigen HR-HPV-Befunde.

34% der Frauen aus dem Gesamtkollektiv (n= 444) sind jünger als 30 Jahre, unter ihnen findet sich in 49% der Fälle eine Infektion mit HR-HPV.

66% der Frauen aus dem Gesamtkollektiv sind älter als 30 Jahre, unter ihnen findet sich in 37% der Fälle eine Positivität für HR-HPV.

Altersverteilung	≤ 30 Jahre (n= 153/ 444)	> 30 Jahre (n= 291/ 444)
Patientinnen	153	291
HR- HPV positiv	75	107
relative Häufigkeiten (%)	≤ 30 Jahre (n= 153/ 444)	> 30 Jahre (n= 291/ 444)
Patientinnen	34	66
HR- HPV positiv	49	37

Tab. 3-5: Relative Häufigkeiten für Alter und HR- HPV- Positivität

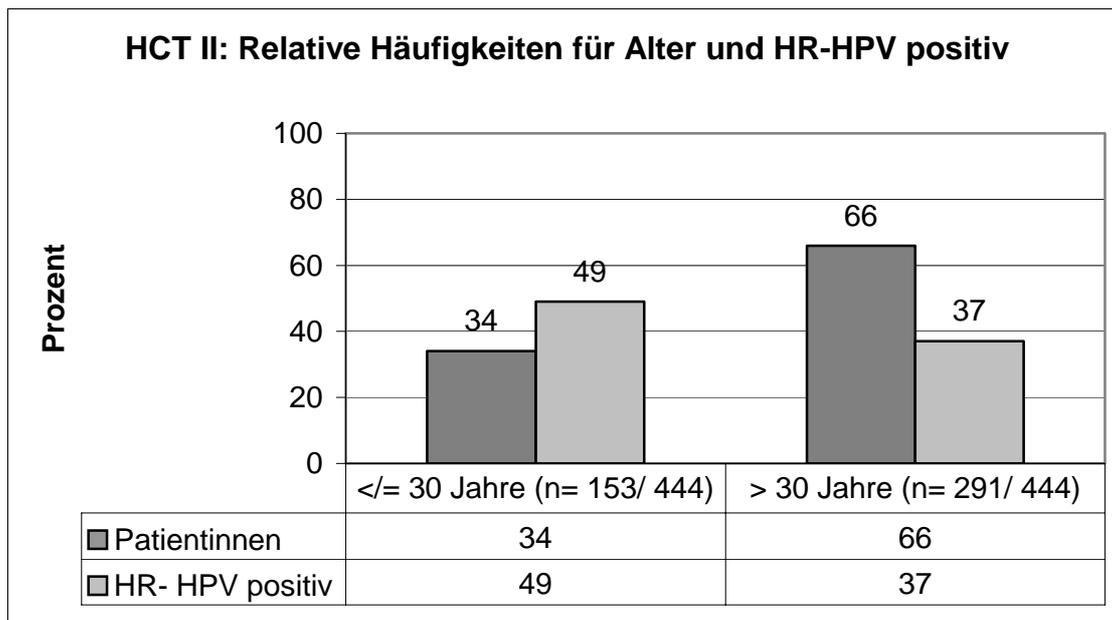


Abb. 3-4: Relative Häufigkeiten für Alter und HR-HPV-Positivität

Zur statistischen Analyse der Beziehung von Alter der Patientin und Positivität für HR-HPV wurde eine Kontingenztabelle angelegt (Tab. 3-6).

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt, dass im vorliegenden Patientenkollektiv junge Frauen im Alter unter 30 Jahren signifikant häufiger mit HR-HPV infiziert sind als Frauen im Alter über 30 Jahren ($p= 0.013$, Tab. 3-7).

HCT II	<= 30 Jahre	> 30 Jahre	Randsummen
HR- HPV positiv (Sonde B)	75	107	182
HR- HPV negativ (Sonde B)	78	184	262
Randsummen	153	291	444

Tab. 3-6: Vierfeldertabelle zu Altersverteilung und Sonde B positiv

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	6,221	1	,013		
Kontinuitätskorrektur	5,725	1	,017		
Likelihood-Quotient	6,185	1	,013		
Exakter Test nach Fisher				,015	,008
Zusammenhang linear-mit-linear	6,207	1	,013		
Anzahl der gültigen Fälle	444				

Tab. 3-7: Chi-Quadrat-Tests zu Altersverteilung und Sonde B positiv

3.1.5 Auswertung der Histologien

Die im Abschnitt 3.1.5 angeführten Daten beinhalten sämtliche histologischen Ergebnisse, die im Untersuchungszeitraum von Mai 1998 bis Juli 1999 für das genannte Kollektiv von 444 Patientinnen erhoben wurden. In tabellarischer Form wird jeweils eine Synopsis von Zytologie, HPV-Test und Histologie gezeigt, insgesamt können Daten zu 194 histologischen Präparaten in die Analyse eingebracht werden. Die Anordnung der Tabellen erfolgt anhand der zugrunde liegenden PAP-Gruppen, besondere Sachverhalte sind grafisch dargestellt.

3.1.5.1 Tabellen

<u>PAP 0 (n=2)</u>								
<u>Histologie (n=2)</u>								
<u>Sonde B pos (n=2)</u>	<u>Methode</u>	<u>Histo negativ</u>	<u>CIN I</u>	<u>CIN II</u>	<u>CIN III</u>	<u>mivCa</u>	<u>PE-Ca</u>	<u>AdCa</u>
	K (n=2)				1			1
<u>Sonde B neg (n=0)</u>	<u>Methode</u>	<u>Histo negativ</u>	<u>CIN I</u>	<u>CIN II</u>	<u>CIN III</u>	<u>mivCa</u>	<u>PE-Ca</u>	<u>AdCa</u>

Tab. 3-8: PAP-Gruppe 0

<u>PAP I (n=9)</u>								
<u>Histologie (n=1)</u>								
<u>Sonde B pos (n=0)</u>	<u>Methode</u>	<u>Histo negativ</u>	<u>CIN I</u>	<u>CIN II</u>	<u>CIN III</u>	<u>mivCa</u>	<u>PE-Ca</u>	<u>AdCa</u>
	HE	1						
<u>Sonde B neg (n=1)</u>	<u>Methode</u>	<u>Histo negativ</u>	<u>CIN I</u>	<u>CIN II</u>	<u>CIN III</u>	<u>mivCa</u>	<u>PE-Ca</u>	<u>AdCa</u>

Tab. 3-9: PAP-Gruppe I

Bei 49 von 194 Patientinnen mit der zytologischen Diagnose PAP II wurde Material zur histologischen Aufarbeitung gewonnen.

Der zugrunde liegende HR-HPV-Test war in 13 Fällen positiv, histologisch fanden sich drei schwere Dysplasien (CIN III) und eine leichte Dysplasie (CIN I).

In den übrigen 36 Fällen war der HR-HPV-Nachweis negativ, histologisch fanden sich 2 leichte Dysplasien (CIN I).

PAP II (n=194)									
Histologie (n=49)									
Sonde B pos (n=13)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa	
	K (n=4)	2			2				
	PE (n=7)	5	1		1				
	ECC (n=1)	1							
	HE (n=1)	1							
Sonde B neg (n=36)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa	
	K (n=3)	3							
	PE (n=18)	16	2						
	ECC (n=12)	12							
	HE (n=3)	3							

Tab. 3-10: PAP-Gruppe II

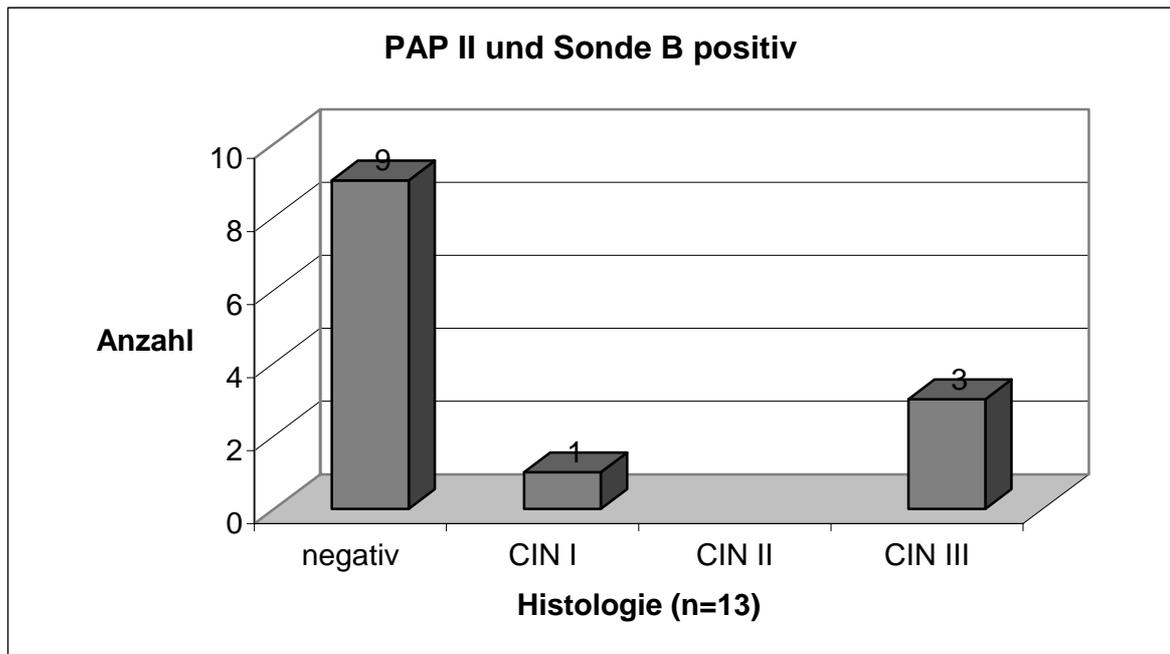


Abb. 3-5: Darstellung zur PAP-Gruppe II

Für die zytologische Diagnosegruppe PAP IIk konnten 19 histologische Befunde ausgewertet werden. Der HR-HPV-Test war in 8 Fällen positiv, histologisch fanden sich eine mittelschwere Dysplasie (CIN II) und eine schwere Dysplasie (CIN III).

PAP IIk (n=69)								
Histologie (n=19)								
Sonde B pos (n=8)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=2)	2						
	PE (n=6)	4		1	1			
Sonde B neg (n=11)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=1)	1						
	PE (n=7)	7						
	ECC (n=2)	2						
	HE (n=1)	1						

Tab. 3-11: PAP-Gruppe II k

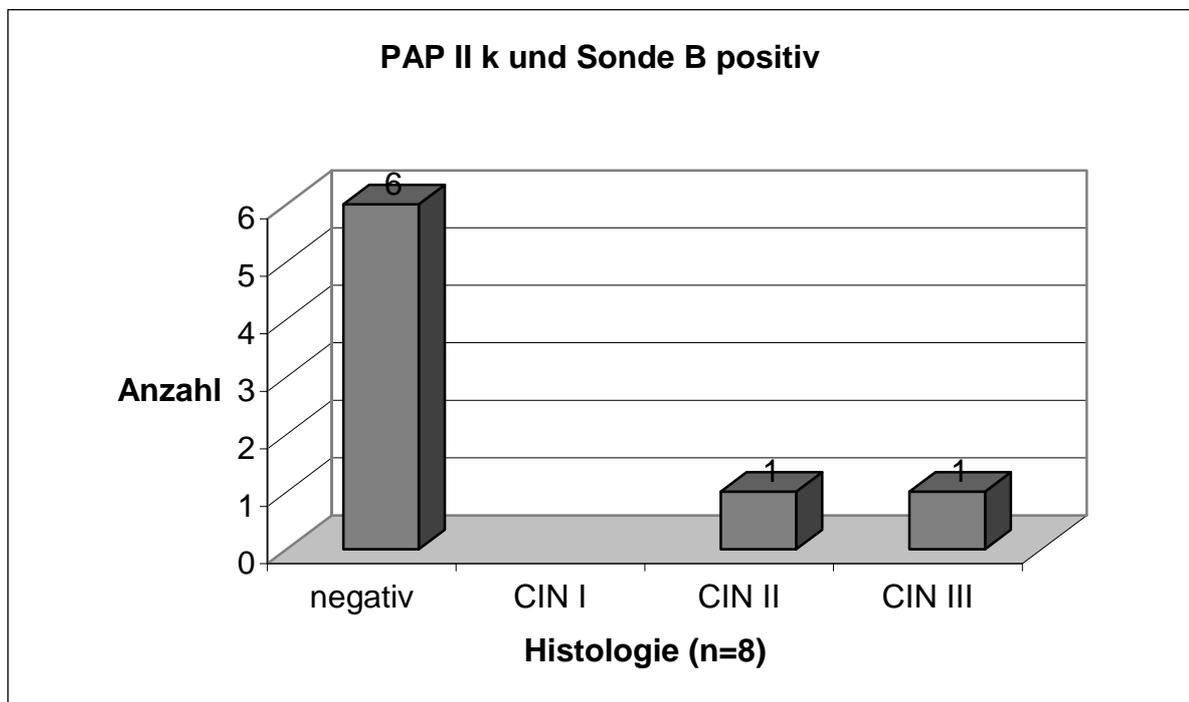


Abb. 3-6: Darstellung zur PAP-Gruppe II k

Für die zytologische Befundgruppe PAP III konnten 16 histologische Befunde ausgewertet werden. Der HR-HPV-Test war in 9 Fällen positiv, histologisch fanden sich vier schwere Dysplasien (CIN III) und eine mittelschwere Dysplasie (CIN II).

PAP III (n=19)								
Histologie (n=16)								
Sonde B pos (n=9)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=5)	2			3			
	PE (n=4)	2		1	1			
Sonde B neg (n=7)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=1)	1						
	PE (n=4)	4						
	Cabr (n=1)	1						
	HE (n=1)	1						

Tab. 3-12: PAP-Gruppe III

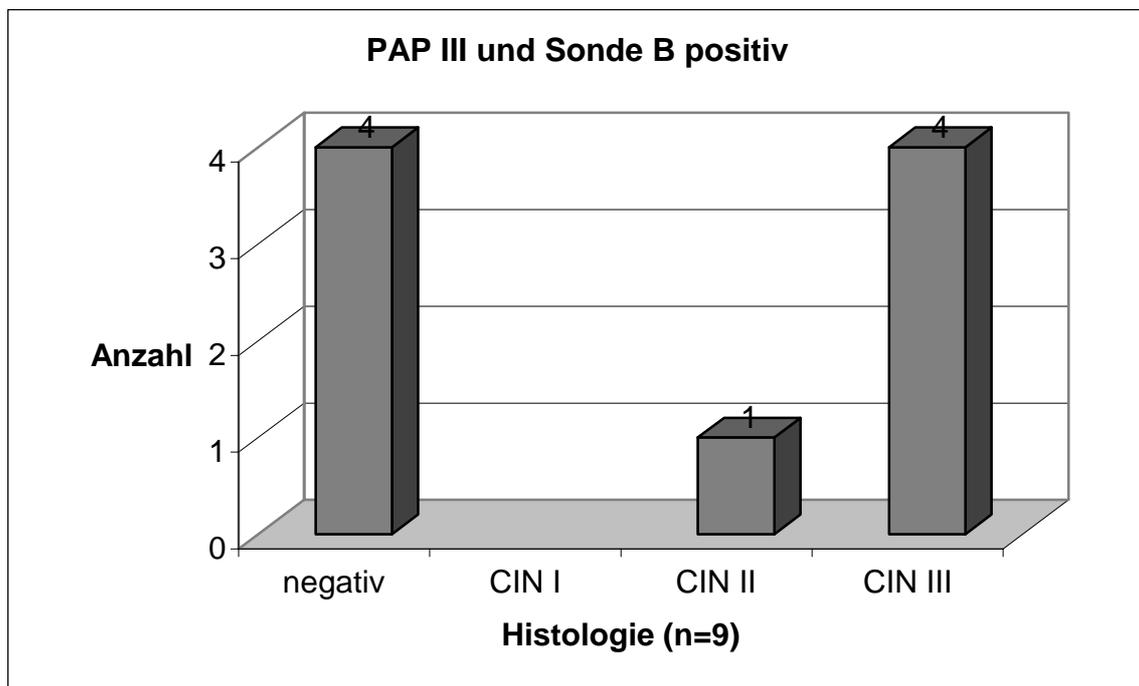


Abb. 3-7: Darstellung zur PAP-Gruppe III

Für die zytologische Gruppe PAP IIID wurden 55 Histologien ausgewertet. In 43 Fällen war der HR-HPV-Nachweis positiv, es fanden sich dabei 12 schwere Dysplasien (CIN III), 6 mittelschwere Dysplasien (CIN II) und 8 leichte Dysplasien (CIN I).

Bei den HR-HPV-negativen Befunden konnte eine mittelschwere Dysplasie (CIN II) ermittelt werden.

PAP IIID (n=92)									
Histologie (n=55)									
Sonde B pos (n=43)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa	
	K (n=23)	6	3	5	9				
	PE (n=20)	11	5	1	3				
Sonde B neg (n=12)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa	
	K (n=4)	3		1					
	PE (n=5)	5							
	ECC (n=3)	3							

Tab. 3-13: PAP-Gruppe IIID

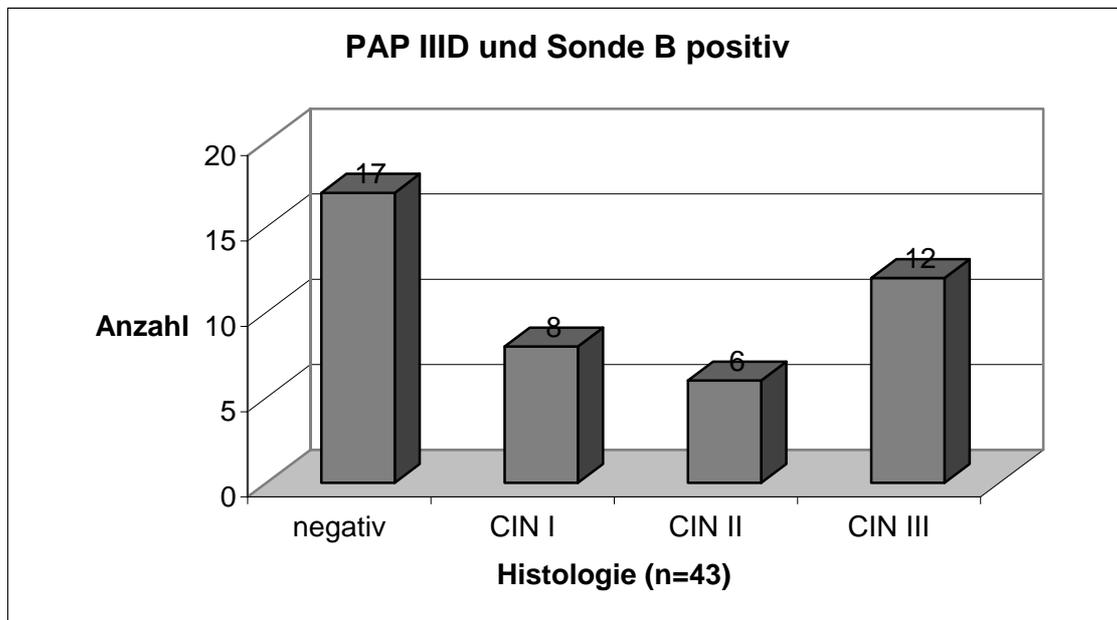


Abb. 3-8: Darstellung zur PAP-Gruppe IIID

Der PAP-Gruppe IVA konnten 41 Histologien zugeordnet werden. In 38 Fällen war der HR-HPV-Nachweis positiv, histologisch zeigten sich dabei zwei mikroinvasive Karzinome (mivCa), 26 schwere Dysplasien (CIN III) und fünf mittelschwere Dysplasien (CIN II).

Bei den HR-HPV-negativen Befunden konnten ein mikroinvasives Karzinom, eine CIN III und eine CIN II ermittelt werden.

PAP IVA (n=44)

Histologie (n=41)

Sonde B pos (n=38)		Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=27)				4	21	2		
	PE (n=10)		4		1	5			
	Cur (n=1)		1						
Sonde B neg (n=3)		Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=3)				1	1	1		

Tab. 3-14: PAP-Gruppe IVA

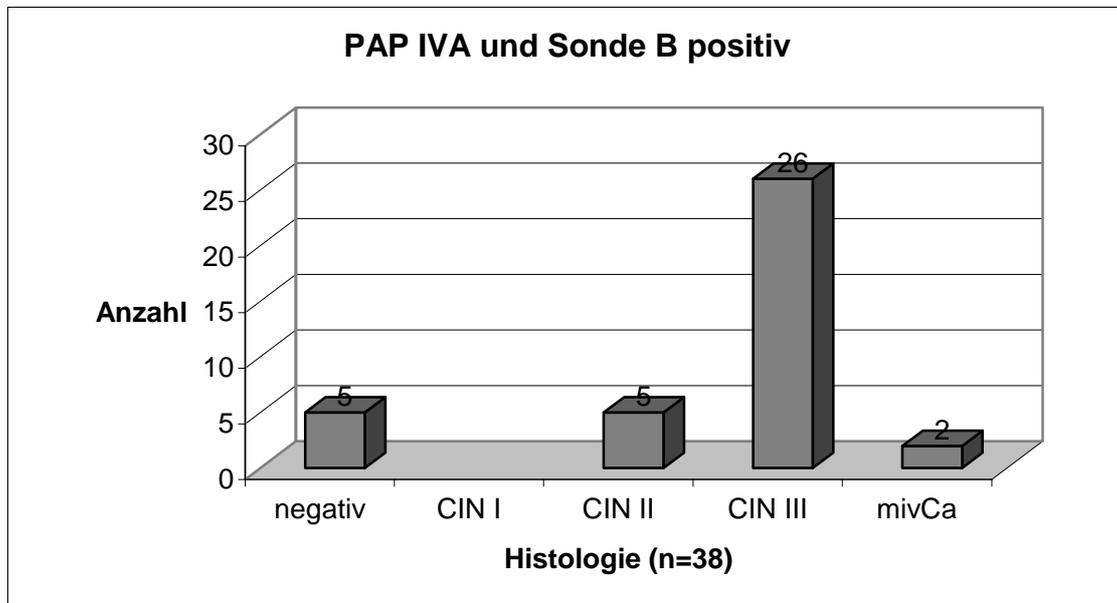


Abb. 3-9: Darstellung zur PAP-Gruppe IVA

Für die PAP-Gruppe IVB wurden zwei Histologien befundet, der HR-HPV-Nachweis war in beiden Fällen positiv, es fanden sich eine CIN III und eine CIN II.

PAP IVB (n=2)									
Histologie (n=2)									
Sonde B pos (n=2)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa	
	K (n=1)			1					
	PE (n=1)				1				
Sonde B neg (n=0)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa	

Tab. 3-15: PAP-Gruppe IV B

Zu 13 Abstrichen der PAP-Gruppe V wurden neun histologische Befunde ausgewertet. In acht Fällen war der HR-HPV-Nachweis positiv, es fanden sich 3 Plattenepithelkarzinome (PE- Ca) und vier schwere Dysplasien (CIN III). Die übrigen 4 Histologien waren auswärtig untersucht worden, es fanden sich 3 Plattenepithelkarzinome der Zervix.

PAP V (n=13)									
Histologie (n=9)									
Sonde B pos (n=8)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa	
	K (n=1)				1				
	HE (n=4)				2		2		
	PE (n=3)	1			1		1		
Sonde B neg (n=1)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa	
	PE (n=1)	1							

Tab. 3-16: PAP-Gruppe V

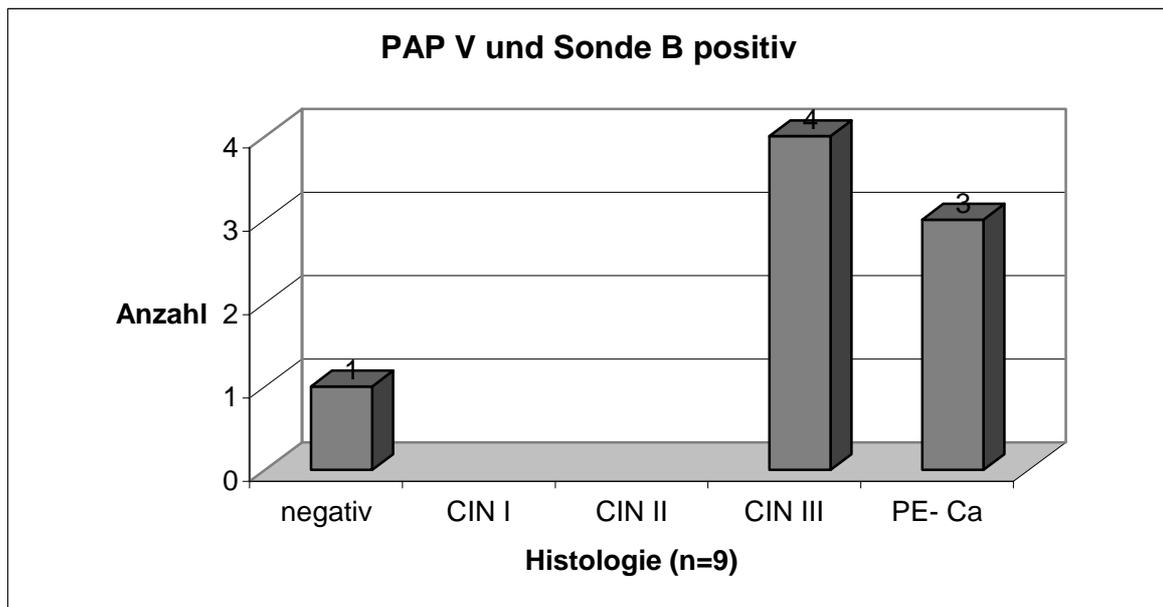


Abb. 3-10: Darstellung zur PAP-Gruppe V

3.1.5.2 Statistische Analyse zum Hybrid Capture Test II (1)

Zur statistischen Analyse der in Abschnitt 3.1.5 erhobenen Daten wurden zunächst die histologischen Ergebnisse sämtlicher Dysplasiegrade (CIN I-III) und Karzinome mit den Befunden der HR-HPV-Testungen (HCT II) in einer Kontingenztafel (Tab. 3-17) korreliert.

Ergebnis Sonde B/ Histologie	Histologie positiv (CIN I-III/ mivCa/ PE-Ca)		Summe
		Histologie negativ	
HR-HPV positiv	81	42	123
HR-HPV negativ	6	65	71
Summe	87	107	194

Tab. 3-17: Vierfeldertafel zum HCT II

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt hierbei einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen positivem Testergebnis für HR-HPV und dem Vorliegen eines pathologischen Histologiebefundes ($p < 0.001$, Tab.3-18).

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	59,970	1	,000		
Kontinuitätskorrektur	57,671	1	,000		
Likelihood-Quotient	67,814	1	,000		
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Zusammenhang linear-mit-linear	59,660	1	,000		
Anzahl der gültigen Fälle	194				

Tab. 3-18: Statistische Auswertung mit Chi- Quadrat- Test

Für den Hybrid Capture Test II konnten die nachfolgend aufgeführten statistischen Maßzahlen mit den in Tab. 3-19 angegebenen Konfidenzintervallen berechnet werden.

HCT II	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,93103	0,85591	0,97427
Spezifität	0,60748	0,50836	0,70048
Positiver Prädiktiver Wert	0,65854	0,56762	0,74162
Negativer Prädiktiver Wert	0,91549	0,82508	0,96835

Tab. 3-19: Statistische Maßzahlen und Konfidenzintervalle (HCT II)

3.1.5.3 Statistische Analyse zum Hybrid Capture Test II (2)

Zur statistischen Analyse der in Abschnitt 3.1.5 erhobenen Daten wurden weiterhin die histologischen Ergebnisse aller höhergradigen Dysplasien (CIN II-III) und Karzinome mit den Befunden der HR-HPV-Testungen (HCT II) in einer Kontingenztafel (Tab. 3-20) korreliert.

Ergebnis Sonde B/ Histologie	Histologie positiv (CIN II/ CIN III/ mivCa/ PE-Ca)		Histologie negativ	Summe
HR- HPV positiv	72		42	114
HR- HPV negativ	4		65	69
Summe	76		107	183

Tab. 3-20: Vierfeldertafel zum HCT II

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt hierbei einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen positivem Testergebnis für HR-HPV und dem Vorliegen eines pathologischen Histologiebefundes ($p < 0.001$).

Für den Hybrid Capture Test II konnten die nachfolgend aufgeführten statistischen Maßzahlen mit den in Tab. 3-21 angegebenen Konfidenzintervallen berechnet werden.

HCT II	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,94737	0,87069	0,98547
Spezifität	0,60748	0,50836	0,70048
Positiver Prädiktiver Wert	0,63158	0,53614	0,72000
Negativer Prädiktiver Wert	0,94203	0,85817	0,98398

Tab. 3-21: Statistische Maßzahlen und Konfidenzintervalle (HCT II)

3.1.5.4 Statistische Analyse zu den PAP-Gruppen IIk und III (Hybrid Capture II)

Nachfolgend werden HPV-Befunde und Ergebnisse der Histologie gemeinsam für die PAP-Gruppen IIk und III in einer Kontingenztafel zusammengestellt (Tab. 3-22).

PAP IIk und PAP III/ Hybrid Capture II	Histologie positiv (CIN II und III)	Histologie negativ	Summe
HR-HPV positiv	7	10	17
HR-HPV negativ	0	18	18
Summe	7	28	35

Tab. 3-22: Kontingenztafel zu den PAP-Gruppen IIk und III

Der Hybrid Capture Test II besitzt für die Erkennung höhergradiger Dysplasien (CIN II und III) innerhalb der PAP-Gruppen IIk und III eine diagnostische Sensitivität von 99.3% ($p < 0.05$ im Exakten Test nach Fisher).

3.1.5.5 Statistische Analyse zur PAP-Gruppe IIID (Hybrid Capture II)

Nachfolgend werden HPV-Befunde und Ergebnisse der Histologie für die PAP-Gruppe IIID in einer Kontingenztafel zusammengestellt (Tab. 3-23).

PAP IIID / Hybrid Capture II	Histologie positiv (CIN II und III)	Histologie negativ	Summe
HR-HPV positiv	18	17	35
HR-HPV negativ	1	11	12
Summe	19	28	47

Tab. 3-23: Kontingenztafel zur PAP-Gruppe IIID

Der Hybrid Capture Test II besitzt für die Erkennung höhergradiger Dysplasien (CIN II und III) innerhalb der PAP-Gruppe IIID eine diagnostische Sensitivität von 94.7% und einen NPV von 91.7% ($p < 0.05$ im Exakten Test nach Fisher).

3.1.5.6 Statistische Analyse der Zytologie

Zur statistischen Analyse der in Abschnitt 3.1.5 erhobenen Daten wurden des Weiteren die histologischen Ergebnisse der höhergradigen Dysplasien und Karzinome mit den Befunden der Zytologie in einer Kontingenztafel (Tab. 3-24) korreliert.

Ergebnis PAP/ Histologie	Histologie positiv (CIN II/CIN III/mivCa/PE-Ca)	Histologie negativ	Summe
PAP positiv (IIID,IVA,IVB,V)	64	35	99
PAP negativ oder unklarer Befund (I,II,IIk,III)	10	72	82
Summe	74	107	181

Tab. 3-24: Vierfeldertafel Zytologien

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt hierbei einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen positivem Zytologie-Befund und dem Vorliegen eines pathologischen Histologiebefundes ($p < 0.001$).

Für die zytologischen Befunde konnten die nachfolgend angeführten statistischen Maßzahlen mit den in Tab. 3-25 angegebenen Konfidenzintervallen berechnet werden.

Zytologie	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0.86486	0.76549	0.93325
Spezifität	0.67290	0.57546	0.76049
Positiver Prädiktiver Wert	0.64646	0.54397	0.73995
Negativer Prädiktiver Wert	0.87805	0.78714	0.93994

Tab. 3-25: Statistische Maßzahlen und Konfidenzintervalle (Zytologie)

3.1.6 Immunhistochemie

Im Zeitraum von Mai 1998 bis Juli 1999 wurde im Rahmen kolposkopischer Untersuchungen und operativer Eingriffe bei 194 Patientinnen Gewebsmaterial zur histologischen Aufarbeitung entnommen. An 79 der 194 histologischen Präparate wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen gegen das L1-Kapsidprotein von HPV durchgeführt.

3.1.6.1 Immunhistochemie (IH)

Zur statistischen Analyse der erhobenen Daten wurden zunächst die Ergebnisse der Immunhistochemien mit den Befunden der zugehörigen histologischen Präparate in einer Kontingenztafel korreliert (Tab. 3-26).

Der Exakte Test nach Fisher zeigt hierbei einen signifikanten Zusammenhang zwischen positiver Immunhistochemie und dem Vorliegen eines pathologischen Histologiebefundes ($p < 0.05$, Tab. 3-27).

Immunhistochemie / Histologie	Histologie positiv (CIN I-III, mivCa, PE-Ca)	Histologie negativ	Summe
IH positiv	21	2	23
IH negativ	38	18	56
Summe	59	20	79

Tab. 3-26: Vierfeldertafel zu IH und Histologien

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signi- fikanz (1- seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	4,741	1	,029		
Kontinuitätskorrektur	3,582	1	,058		
Likelihood-Quotient	5,474	1	,019		
Exakter Test nach Fisher				,044	,024
Zusammenhang linear-mit-linear	4,681	1	,031		
Anzahl der gültigen Fälle	79				

Tab. 3-27: Chi-Quadrat-Tests zu IH und Histologien (Signifikanz im Exakten Test)

3.1.6.2 Hybrid Capture Test II und Immunhistochemie

Zum Vergleich der verschiedenen HPV-Nachweismethoden Hybrid Capture Test II und Immunhistochemie sind in Tab. 3-28 und Tab. 3-29 die errechneten statistischen Maßzahlen beider Verfahren zusammengestellt.

Immunhistochemie	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,35593	0,23555	0,49132
Spezifität	0,90000	0,68302	0,98765
Positiver Prädiktiver Wert	0,91304	0,71962	0,98929
Negativer Prädiktiver Wert	0,32143	0,20286	0,45964

Tab. 3-28: Immunhistochemie

HCT II	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,93103	0,85591	0,97427
Spezifität	0,60748	0,50836	0,70048
Positiver Prädiktiver Wert	0,65854	0,56762	0,74162
Negativer Prädiktiver Wert	0,91549	0,82508	0,96835

Tab. 3-29: Hybrid Capture Test II

3.1.7 Auswertung der „Relative Light Units“ (RLU's) im Hybrid-Capture Test II

Der Nachweis von HPV erfolgt im Hybrid Capture Assay über enzymatisch vermittelte Lichtemission (Chemolumineszenz). Die Intensität des gemessenen Lichtsignals wird in Relative Light Units (RLU) angegeben und zeigt an, ob eine Probe HPV-DNA enthält (qualitativer Nachweis).

Die folgenden Kontingenztafeln zeigen sämtliche RLU-Daten des HCT II (HR-HPV-Sonde positiv) in Korrelation zur zugrunde liegenden Histologie.

Die RLU-Daten sind jeweils in 5 Gruppen unterteilt, Tab. 3-30 zeigt die absoluten RLU-Werte, Tab. 3-31 die relativen RLU-Werte bezogen auf die Positivkontrolle des einzelnen Testansatzes.

Ein quantitativer Zusammenhang zwischen RLU-Intensität (Virusload) und Dysplasiegrad lässt sich hierbei nicht ermitteln.

Histologie/ RLU	100- 10.000	10.000- 100.000	100.000- 200.000	200.000- 400.000	400.000- 800.000	Summe
negativ	22	16	5	6	6	55
CIN I	3	2	1	2	1	9
CIN II	2	1	3	3	3	12
CIN III	14	16	7	5	1	43
Karzinom	1	2	0	1	0	4
Summe	42	37	16	17	11	123

RLU	
Mittelwert	122082
max	756795
min	190

Tab. 3-30: Kontingenztafel RLU (absolute Werte) und Histologien

Histologie und RLU/ PCB	1- 700	700- 1400	1400- 2100	2100- 2800	2800- 3500	Summe
negativ	41	4	5	3	2	55
CIN I	6	1	2	0	0	9
CIN II	6	4	0	2	0	12
CIN III	34	8	1	0	0	43
Karzinom	3	0	1	0	0	4
Summe	90	17	9	5	2	123

B RLU/ PCB	
Mittelwert	514
max	3226
min	1

Tab. 3-31: Kontingenztafel RLU (relative Werte) und Histologien

3.2 Hybrid Capture Test I

Der Abschnitt 3.2 beschreibt die an 220 Patientinnen im Zeitraum von März 1997 bis Juni 1998 erhobenen Befunde. Während dieses Zeitraumes kam im Zytologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Münster als HPV-Nachweisverfahren die ältere Testmethode Hybrid Capture I zur Anwendung.

3.2.1 Häufigkeiten der PAP-Abstriche

Tab. 3-32 und Abb. 3-11 zeigen die Häufigkeitsverteilungen der Abstriche nach Papanicolaou in dem o.a. Kollektiv von 220 Patientinnen. Die Materialentnahme für PAP-Abstrich und konsekutive HPV-Testung mittels HCT I erfolgte im Rahmen derselben gynäkologischen Untersuchung.

Mit einer relativen Häufigkeit von 51,4% ist der Anteil der PAP-Gruppe II am größten.

Der Anteil unklarer zytologischer Befunde (PAP-Gruppen IIk und III) beträgt 6,8%.

Abstriche mit Zellen einer schweren Dysplasie oder Zellen eines malignen Tumors haben bei den untersuchten Patientinnen einen Anteil von 11,8% (PAP IVA, IVB, V).

PAP	Anzahl	Rel. Hfkt. (%)
0	1	0,5
I	19	8,6
II	113	51,4
II k	9	4,1
III	6	2,7
III D	46	20,9
IVA	15	6,8
IVB	0	0
V	11	5
	220	100

Tab. 3-32: Absolute und relative Häufigkeiten der PAP- Gruppen

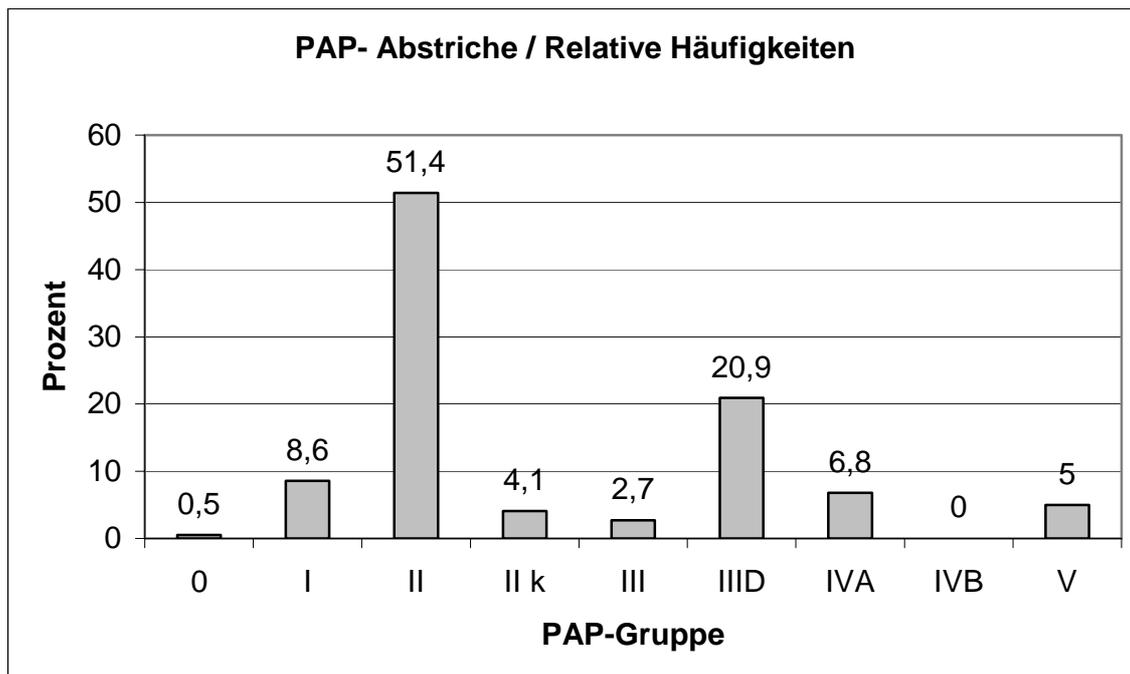


Abb. 3-11: Darstellung der relativen Häufigkeiten

3.2.2 HR-HPV-positive Befunde („high-risk“-Sonde B)

Tab. 3-33 und Abb. 3-12 beschreiben die mit der HCT I-Methode im genannten Patientenkollektiv erhobenen Häufigkeitsverteilungen von HR-HPV positiven Befunden in Korrelation zu den unter 3.2.1 angeführten PAP-Befunden.

74 von 220 untersuchten Patientinnen haben dabei einen Nachweis von HR-HPV. Das entspricht einem Anteil von 34% (Prävalenz bei negativer Zytologie 11%).

PAP-Gruppe	Anzahl	PAP rel. Hfkt. (%)	Sonde B positiv	Sonde B positiv rel. Hfkt. (%)
0	1	0,5	0	0
I	19	8,6	5	26,3
II	113	51,4	17	15
II k	9	4,1	2	22,2
III	6	2,7	2	33,3
IIID	46	20,9	31	67,4
IVA	15	6,8	13	86,7
IVB	0	0	0	0
V	11	5	4	36,4
	220	100	74	

Tab. 3-33: Absolute und relative Häufigkeiten für die „high-risk“-Sonde B

Aus der grafischen Darstellung in Abb. 3-12 ist ersichtlich, dass die relative Häufigkeit des HR-HPV-Nachweises über die einzelnen PAP-Gruppen zunimmt.

Bei zytologischem Nachweis von Zellen einer schweren Dysplasie (PAP IVA) läßt sich in 86,7% der Fälle HR-HPV-DNA mittels HCT I nachweisen.

Beim zytologischen Nachweis von Karzinomzellen (PAP V) sinkt der Anteil von HR-HPV-DNA in den vorliegenden Daten auf 36,4%.

Bei den unklaren zytologischen Diagnosen PAP IIk und III kann in 22 bzw. 33% der HC I-Testungen HR-HPV-DNA nachgewiesen werden.

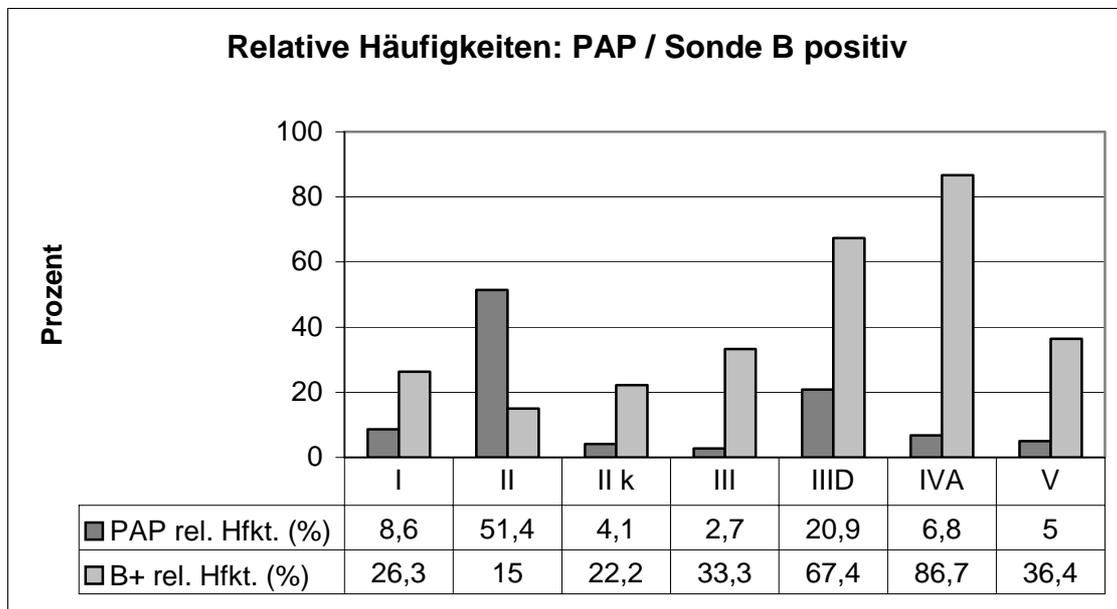


Abb. 3-12: Darstellung der relativen Häufigkeiten für PAP-Gruppen und Sonde B

3.2.3 „Test gegen den Trend“

Zur statistischen Analyse der in Abschnitt 3.2.2 dargestellten Beziehung zwischen Zytologie (PAP-Gruppe) und HC I-Test (Nachweis von HR-HPV) wurde der „Test gegen den Trend“ eingesetzt.

Die Nullhypothese bei diesem Test ist das Fehlen eines Trends (einer Beziehung) zwischen PAP-Gruppe und HR-HPV-Positivität.

Die ermittelte Prüfgröße T ist hierbei deutlich positiv und beträgt 6,1.

Damit besteht ein hochsignifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$, Quantile der Normalverteilung) zwischen Dysplasiegrad (PAP-Gruppe) und Nachweis von HR-HPV mittels HCT I.

PAP- Gruppe	i (Nr. der Gruppe)	B+ (ni1)	B - (ni2)	Anzahl (ni)	i*ni1	i*ni	i2*ni
I	1	5	14	19	5	19	19
II	2	17	96	113	34	226	452
II k	3	2	7	9	6	27	81
III	4	2	4	6	8	24	96
III D	5	31	15	46	155	230	1150
IV A	6	13	2	15	78	90	540
V	8	4	7	11	32	88	704
		74	145	219	318	704	3042

Tab. 3-34: Test gegen den Trend

$$T = \frac{n \sum_{i=1}^r i n_{i1} - n_g \sum_{i=1}^r i n_{ig}}{\sqrt{\frac{n_g n_g}{n-1} (n \sum_{i=1}^r i^2 n_{ig} - (\sum_{i=1}^r i n_{ig})^2)}} \quad (\text{Grundformel für Prüfgröße T})$$

$$T = \frac{219 \cdot 318 - 74 \cdot 704}{\sqrt{\frac{74 \cdot 74}{218} (219 \cdot 3042 - 704^2)}} = \frac{17546}{\sqrt{49,2 \cdot 70582}} = \frac{17546}{2897} = 6,1$$

3.2.4 Altersverteilungen zum Hybrid Capture Test I (HR-HPV-positive Befunde)

Bei 74 von insgesamt 220 Patientinnen konnte mit der HCT I-Methode ein positiver Nachweis für HR-HPV geführt werden, das entspricht einem Anteil von 34%.

Tab. 3-35 und Abb. 3-13 zeigen eine Aufteilung aller Patientinnen in zwei Altersgruppen (≤ 30 Jahre bzw. > 30 Jahre) sowie die absoluten und relativen Häufigkeiten der zugehörigen HR-HPV-Befunde.

31% der Frauen aus dem Gesamtkollektiv (n= 220) sind jünger als 30 Jahre, unter ihnen findet sich in 45% der Fälle eine Infektion mit HR-HPV.

69% der Frauen aus dem Gesamtkollektiv sind älter als 30 Jahre, unter ihnen findet sich in 28% der Fälle eine Positivität für HR-HPV.

Altersverteilung	≤ 30 Jahre (n= 69 / 220)	> 30 Jahre (n= 151 / 220)
Patientinnen	69	151
HR-HPV positiv	31	43
relative Häufigkeiten (%)	≤ 30 Jahre (n= 69 / 220)	> 30 Jahre (n= 151 / 220)
Patientinnen	31	69
HR-HPV positiv	45	28

Tab. 3-35: Relative Häufigkeiten für Alter und HR-HPV-Positivität

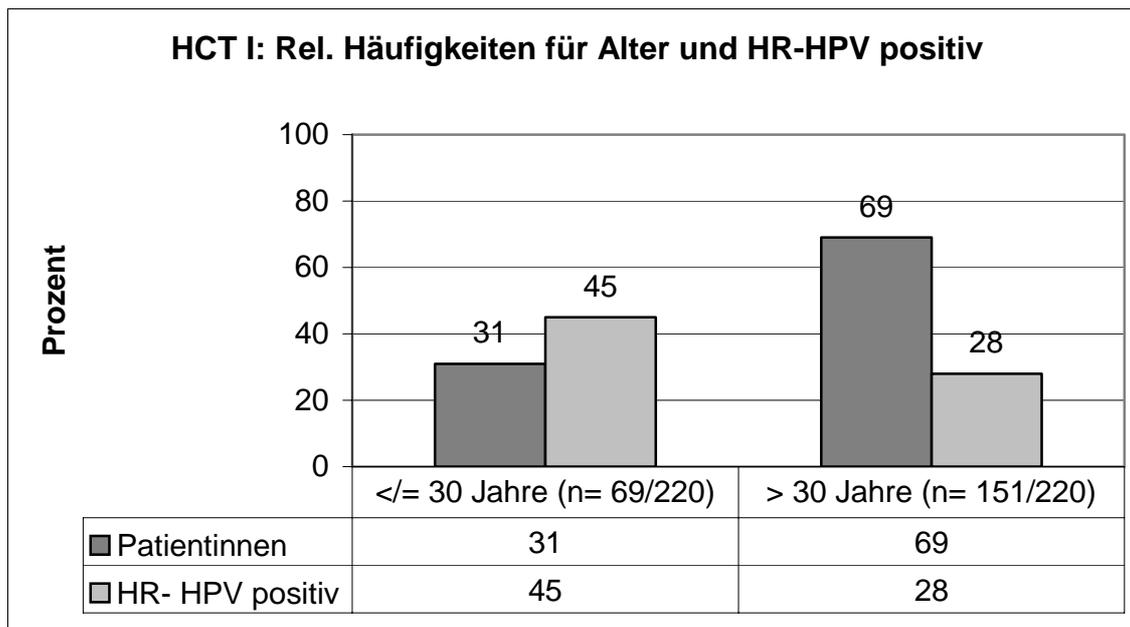


Abb. 3-13: Relative Häufigkeiten für Alter und HR-HPV-Positivität

Zur statistischen Analyse der Beziehung von Alter der Patientin und Positivität für HR-HPV wurde eine Kontingenztafel angelegt (Tab. 3-36).

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt, dass im vorliegenden Patientenkollektiv junge Frauen im Alter unter 30 Jahren signifikant häufiger mit HR-HPV infiziert sind als Frauen im Alter über 30 Jahren ($p= 0.017$, Tab. 3-37).

HCT I	<= 30 Jahre	> 30 Jahre	Randsumme
Sonde B positiv	31	43	74
Sonde B negativ	38	108	146
Randsumme	69	151	220

Tab. 3-36: Vierfeldertafel zu Altersverteilung und Sonde B positiv

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,742	1	,017		
Kontinuitätskorrektur	5,028	1	,025		
Likelihood-Quotient	5,623	1	,018		
Exakter Test nach Fisher				,021	,013
Zusammenhang linear-mit-linear	5,716	1	,017		
Anzahl der gültigen Fälle	220				

Tab. 3-37: Chi-Quadrat-Tests zu Altersverteilung und Sonde B positiv

3.2.5 Auswertung der Histologien

Die im Abschnitt 3.2.5 angeführten Daten beinhalten sämtliche histologischen Ergebnisse, die im Untersuchungszeitraum von März 1997 bis Juni 1998 für das genannte Kollektiv von 220 Patientinnen erhoben wurden. In tabellarischer Form wird jeweils eine Synopsis von Zytologie, HPV-Test und Histologie gezeigt, insgesamt können Daten zu 92 histologischen Präparaten in die Analyse eingebracht werden. Die Anordnung der Tabellen erfolgt anhand der zugrunde liegenden PAP-Gruppen, besondere Sachverhalte sind grafisch dargestellt.

3.2.5.1 Tabellen

PAP I (n=19)								
Histologie (n=4)								
Sonde B pos (n=1)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	PE (n=1)	1						
Sonde B neg (n=3)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	HE (n=2)	2						
	ECC (n=1)	1						

Tab. 3-38: PAP-Gruppe I

PAP II (n=113)								
Histologie (n=31)								
Sonde B pos (n=4)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=2)	1	1					
	HE (n=1)	1						
	PE (n=1)	1						
Sonde B neg (n=27)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=4)	1	1		2			
	HE (n=5)	5						
	PE (n=14)	13	1					
	ECC (n=4)	4						

Tab. 3-39: PAP-Gruppe II

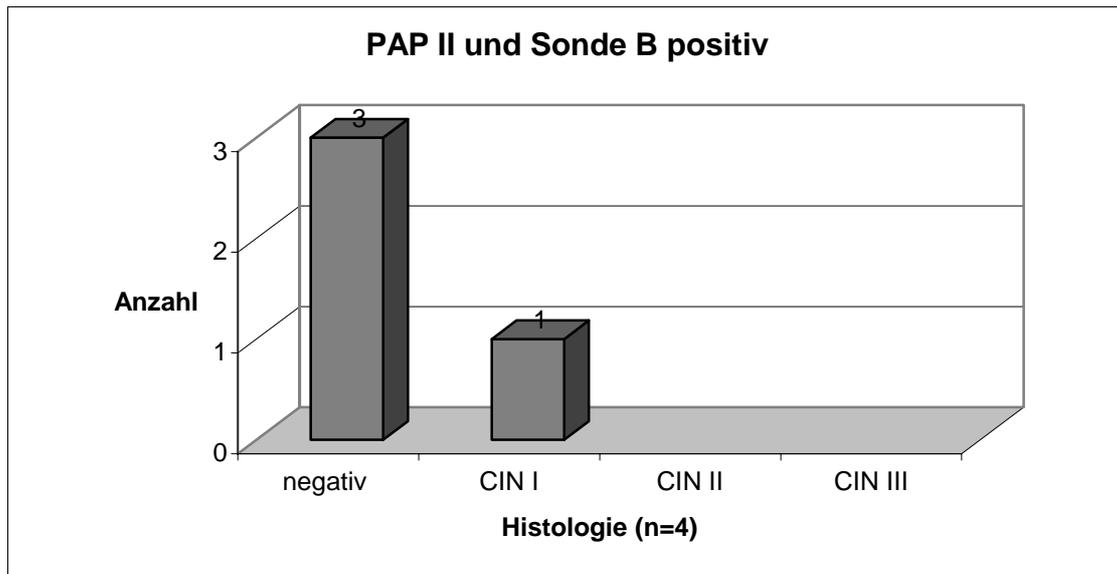


Abb. 3-14: Darstellung zur PAP-Gruppe II

PAP IIk (n=9)								
Histologie (n=2)								
Sonde B pos (n=0)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
Sonde B neg (n=2)	Methode	Histo negativ						
	HE (n=1)	1						
	PE (n=1)	1						

Tab. 3-40: PAP- Gruppe II k

PAP III (n=6)								
Histologie (n=4)								
Sonde B pos (n=1)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=1)	1						
Sonde B neg (n=3)	Methode	Histo negativ						
	HE (n=1)						1	
	PE (n=1)	1						
	ECC (n=1)	1						

Tab. 3-41: PAP- Gruppe III

PAP IIID (n=46)

Histologie (n=31)

Sonde B pos (n=20)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	miVCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=11)	2		4	5			
	HE (n=1)						1	
	PE (n=8)	4	2		2			

Sonde B neg (n=11)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	miVCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=1)		1					
	PE (n=10)	9		1				

Tab. 3-42: PAP-Gruppe IIID

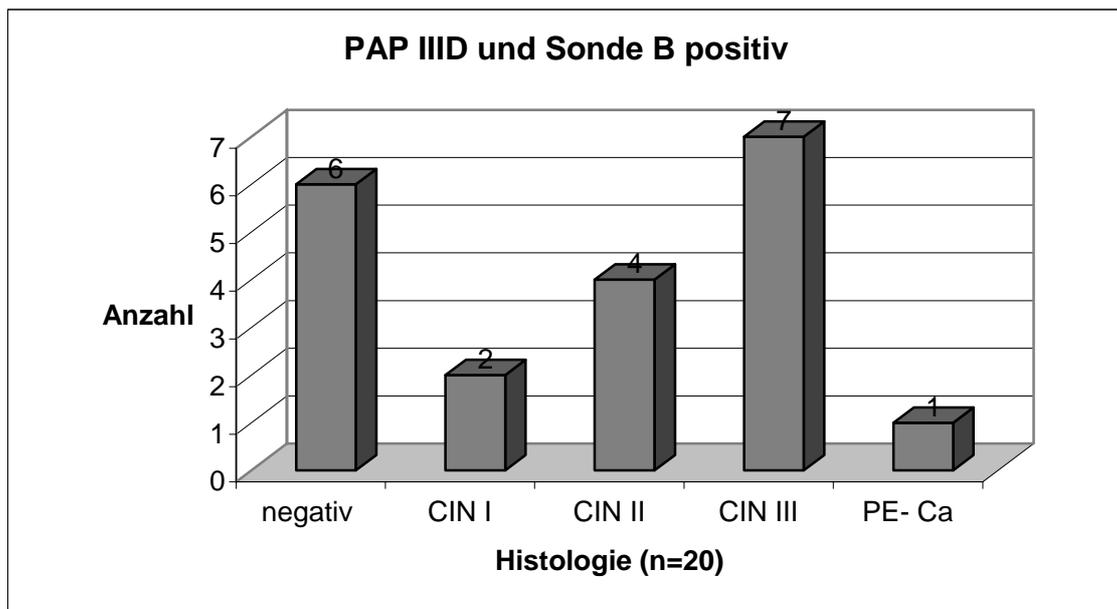


Abb. 3-15: Darstellung zur PAP-Gruppe IIID

PAP IVA (n=15)

Histologie (n=14)

Sonde B pos (n=12)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=8)	2		1	5			
	PE (n=3)	2			1			
	ECC (n=1)	1						

Sonde B neg (n=2)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	mivCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=2)				2			

Tab. 3-43: PAP-Gruppe IVA

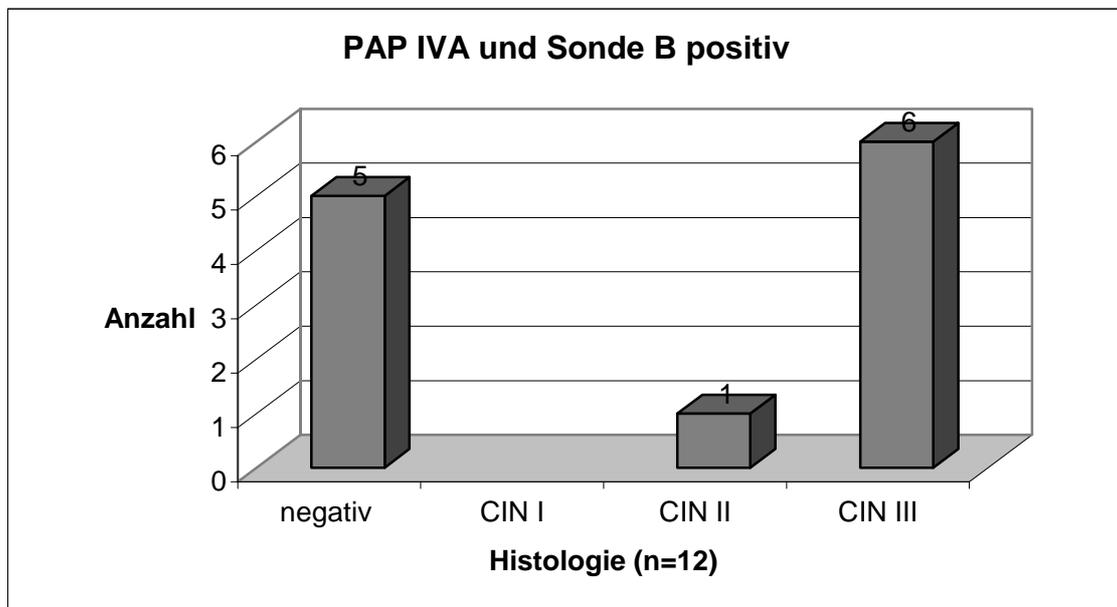


Abb. 3-16: Darstellung zur PAP- Gruppe IVA

PAP V (n=11)								
Histologie (n=6)								
Sonde B pos (n=2)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	miVCa	PE-Ca	AdCa
	K (n=1)						1	
	HE (n=1)						1	
Sonde B neg (n=4)	Methode	Histo negativ	CIN I	CIN II	CIN III	miVCa	PE-Ca	AdCa
	HE (n=3)						3	
	ECC (n=1)	1						

Tab. 3-44: PAP-Gruppe V

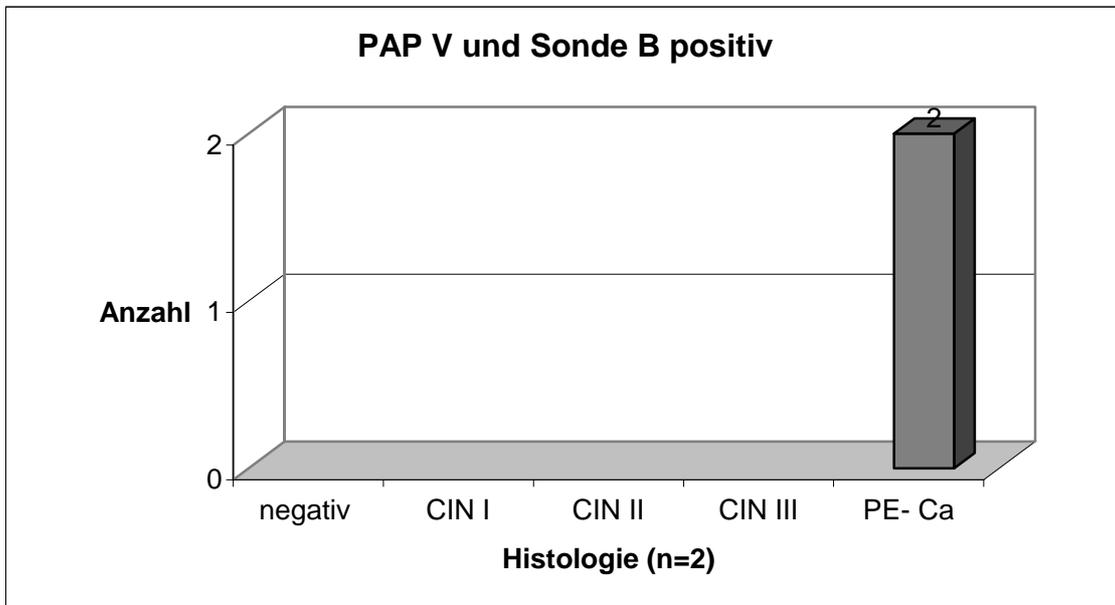


Abb. 3-17: Darstellung zur PAP-Gruppe V

3.2.5.2 Statistische Analyse zum Hybrid Capture Test I (1)

Zur statistischen Analyse der in Abschnitt 3.2.5 erhobenen Daten wurden zunächst die histologischen Ergebnisse sämtlicher Dysplasiegrade (CIN I-III) und Karzinome mit den Befunden der HR-HPV-Testungen (HCT I) in einer Kontingenztafel (Tab. 3-45) korreliert.

Ergebnis Sonde B / Histologie	Histologie positiv (CIN I- III/ mivCa/ PE-Ca/ AdCa)	Histologie negativ	Summe
HR-HPV positiv	24	16	40
HR-HPV negativ	12	40	52
Summe	36	56	92

Tab. 3-45: Vierfeldertafel zum HCT I

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt hierbei einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen positivem Testergebnis für HR-HPV und dem Vorliegen eines pathologischen Histologiebefundes ($p < 0.001$, Tab.3-46).

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifi- kanz (2- seitig)	Exakte Signi- fikanz (1- seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	12,941	1	,000		
Kontinuitätskorrektur	11,437	1	,001		
Likelihood-Quotient	13,134	1	,000		
Exakter Test nach Fisher				,001	,000
Zusammenhang linear-mit-linear	12,800	1	,000		
Anzahl der gültigen Fälle	92				

Tab. 3-46: Statistische Auswertung mit Chi-Quadrat-Test

Für den Hybrid Capture Test I konnten die nachfolgend angeführten statistischen Maßzahlen mit den in Tab. 3-47 angegebenen Konfidenzintervallen berechnet werden.

HCT I	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,66667	0,49030	0,81444
Spezifität	0,71429	0,57790	0,82705
Positiver Prädiktiver Wert	0,60000	0,43327	0,75135
Negativer Prädiktiver Wert	0,76923	0,63160	0,87468

Tab. 3-47: Statistische Maßzahlen und Konfidenzintervalle (HCT I)

3.2.5.3 Statistische Analyse zum Hybrid Capture Test I (2)

Zur statistischen Analyse der in Abschnitt 3.2.5 erhobenen Daten wurden zudem die histologischen Ergebnisse aller höhergradigen Dysplasien (CIN II-III) und Karzinome mit den Befunden der HR-HPV-Testungen (HCT I) in einer Kontingenztafel (Tab. 3-48) korreliert.

Ergebnis Sonde B / Histologie	Histologie positiv (CIN II/ CIN III/ mivCa/ PE-Ca/ AdCa)		Histologie negativ	Summe
HR-HPV positiv	21		16	37
HR-HPV negativ	9		40	49
Summe	30		56	86

Tab. 3-48: Vierfeldertafel zum HCT I

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt hierbei einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen positivem Testergebnis für HR-HPV und dem Vorliegen eines pathologischen Histologiebefundes ($p < 0.001$).

Für den Hybrid Capture Test I konnten die nachfolgend angeführten statistischen Maßzahlen mit den in Tab. 3-49 angegebenen Konfidenzintervallen berechnet werden.

HCT I	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,70000	0,50604	0,85265
Spezifität	0,71429	0,57790	0,82705
Positiver Prädiktiver Wert	0,56757	0,39489	0,72902
Negativer Prädiktiver Wert	0,81633	0,67978	0,91241

Tab. 3-49: Statistische Maßzahlen und Konfidenzintervalle (HCT I)

3.2.5.4 Statistische Analyse der Zytologie

Zur statistischen Analyse der in Abschnitt 3.2.5 erhobenen Daten wurden des Weiteren die histologischen Ergebnisse der höhergradigen Dysplasien und Karzinome mit den Befunden der Zytologie in einer Kontingenztafel (Tab. 3-50) korreliert.

Ergebnis PAP / Histologie	Histologie positiv (CIN II/CIN III/mivCa/PE-Ca)	Histologie negativ	Summe
PAP positiv (IIID, IVA, V)	27	21	48
PAP negativ oder unklarer Befund (I,II,IIk,III)	3	35	38
Summe	30	56	86

Tab. 3-50: Vierfeldertafel Zytologien

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt hierbei einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen positivem Zytologie-Befund und dem Vorliegen eines pathologischen Histologiebefundes ($p < 0.001$).

Für die zytologischen Befunde konnten die nachfolgend angeführten statistischen Maßzahlen mit den in Tab. 3-51 angegebenen Konfidenzintervallen berechnet werden.

Zytologie	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,90000	0,73471	0,97888
Spezifität	0,62500	0,48548	0,75082
Positiver Prädiktiver Wert	0,56250	0,41181	0,70520
Negativer Prädiktiver Wert	0,92105	0,78623	0,98341

Tab. 3-51: Statistische Maßzahlen und Konfidenzintervalle (Zytologie)

3.2.6 Synopsis von HCT I, HCT II und Zytologie

Für den Hybrid Capture Test I konnten die nachfolgend aufgeführten statistischen Maßzahlen mit den in Tab. 3-52 und Tab. 3-53 angegebenen Konfidenzintervallen berechnet werden.

HCT I	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,66667	0,49030	0,81444
Spezifität	0,71429	0,57790	0,82705
Positiver Prädiktiver Wert	0,60000	0,43327	0,75135
Negativer Prädiktiver Wert	0,76923	0,63160	0,87468

Tab. 3-52: Maßzahlen und Konfidenzintervalle zum Hybrid Capture Test I für die Erkennung aller Dysplasiegrade (CIN I-III) und Karzinome (Kap. 3.2.5.2)

HCT I	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,70000	0,50604	0,85265
Spezifität	0,71429	0,57790	0,82705
Positiver Prädiktiver Wert	0,56757	0,39489	0,72902
Negativer Prädiktiver Wert	0,81633	0,67978	0,91241

Tab. 3-53: Maßzahlen und Konfidenzintervalle zum Hybrid Capture Test I für die Erkennung höhergradiger Dysplasien (CIN II-III) und Karzinome (Kap. 3.2.5.3)

HCT II	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,93103	0,85591	0,97427
Spezifität	0,60748	0,50836	0,70048
Positiver Prädiktiver Wert	0,65854	0,56762	0,74162
Negativer Prädiktiver Wert	0,91549	0,82508	0,96835

Tab. 3-54: Maßzahlen und Konfidenzintervalle zum Hybrid Capture Test II für die Erkennung aller Dysplasiegrade (CIN I-III) und Karzinome (Kap. 3.1.5.2)

HCT II	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,94737	0,87069	0,98547
Spezifität	0,60748	0,50836	0,70048
Positiver Prädiktiver Wert	0,63158	0,53614	0,72000
Negativer Prädiktiver Wert	0,94203	0,85817	0,98398

Tab. 3-55: Maßzahlen und Konfidenzintervalle zum Hybrid Capture Test II für die Erkennung höhergradiger Dysplasien (CIN II-III) und Karzinome (Kap. 3.1.5.3)

Zytologie (HCT II)	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,86486	0,76549	0,93325
Spezifität	0,67290	0,57546	0,76049
Positiver Prädiktiver Wert	0,64646	0,54397	0,73995
Negativer Prädiktiver Wert	0,87805	0,78714	0,93994

Tab. 3-56: Maßzahlen und Konfidenzintervalle zur Zytologie (Zeitraum HCT II) (Kap. 3.1.5.5)

Zytologie (HCT I)	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Sensitivität	0,90000	0,73471	0,97888
Spezifität	0,62500	0,48548	0,75082
Positiver Prädiktiver Wert	0,56250	0,41181	0,70520
Negativer Prädiktiver Wert	0,92105	0,78623	0,98341

Tab. 3-57: Maßzahlen und Konfidenzintervalle zur Zytologie (Zeitraum HCT I) (Kap. 3.2.5.4)

4 Diskussion

Der Stellenwert des HPV-Nachweises in der klinischen Routine sowie dessen mögliche Etablierung im Krebsvorsorgeprogramm ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussionen und Studien. Für bestimmte klinische Situationen belegen die bisherigen Daten den Nutzen einer zusätzlichen HPV-Diagnostik, der routinemäßige Einsatz eines HPV-Screenings wird derzeit als voreilig eingestuft. Im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchung steht die klinische Anwendung der Hybrid Capture Methode zum Nachweis von HPV bei insgesamt 664 Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Münster. Die wichtigsten aus dem Patientenkollektiv erhobenen Beobachtungen und Daten sollen im Folgenden kritisch analysiert und in Bezug zu den Ergebnissen anderer Autoren gesetzt werden.

4.1 Prävalenz von Humanen Papillomaviren (HPV)

Die Prävalenz von HR-HPV unter den Frauen, die mit der Hybrid Capture II-Methode getestet wurden (3.1.2), beträgt in der vorliegenden Untersuchung 41%. Bei den zytologisch Negativen liegt der Anteil von HR-HPV bei 12%.

Die ermittelten Prävalenzwerte liegen hier wesentlich höher als in aktuellen Studien mit deutlich größeren Fallzahlen. In der sog. Jena-Studie von *Schneider et al.* (93) besteht unter 4.761 rekrutierten Frauen eine Prävalenz von 7.8% für HR-HPV, eine große Studie in Neufundland/ Kanada (87) zeigt einen Anteil von 10.8% HR-HPV-DNA unter 2.098 Patientinnen. Eine noch offene holländische Screeningstudie hat bislang einen Anteil von 3.4% HR-HPV unter 13.500 zytologisch negativen Frauen gefunden, die Tübinger Screeningstudie von *Iftner et al.* umfasst derzeit 7.666 Patientinnen mit einer HR-HPV-Prävalenz von 6.2% (Abstracts) (17).

Die Unterschiede der Prävalenzwerte kommen dadurch zustande, dass die angeführten Studien Frauen aus der allgemeinen Routinevorsorge rekrutiert haben, während in die vorliegende Arbeit Patientinnen einer Universitätsfrauenklinik mit mehrheitlich bereits bestehenden auffälligen Befunden oder besonderen Krankheitsbildern Eingang fanden (2.1).

Gemeinsam stellen sie ein Risikokollektiv mit einem hohen Anteil an HPV-Infektionen dar. Aus den erhobenen Daten lassen sich eindeutige und signifikante Aussagen zur Beurteilung der Hybrid Capture Methode machen.

4.2 HPV-Infektion und zervikale Karzinogenese

Innerhalb des genannten Risikokollektivs wurden 444 Patientinnen mit der Hybrid Capture II-Methode auf das Vorhandensein von HR-HPV-DNA getestet. Dabei zeigt die statistische Analyse mit dem „Test gegen den Trend“ (3.1.3) einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen Dysplasiegrad in der Zytologie und dem Nachweis von HR-HPV ($p < 0.001$).

Diese eindeutige Korrelation von HPV-Infektion und zervikaler Dysplasie ist in der Literatur durch eine Vielzahl von Studien belegt, wobei als Methode zum Nachweis von HPV-DNA mehrheitlich die PCR zur Anwendung kam.

Schiffman et al. zeigten, dass die Mehrzahl aller zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) einer Infektion mit HR-HPV zugeschrieben werden kann (91). *Koutsky et al.* beschrieben die Entstehung einer CIN als häufige und frühe Manifestation einer Infektion der Zervix mit HR-HPV (59), und *Bosch et al.* konnten die virale Ätiologie von CIN III für HR-HPV belegen (16). Für das invasive Zervixkarzinom konnten *Munoz et al.* (76) auf die enge Assoziation zu HR-HPV-Typen hinweisen. *Walboomers, Bosch und Cuzick et al.* beschrieben für das manifeste Zervixkarzinom eine HPV-Prävalenz von bis zu 99.7% (15;32;110).

Insgesamt wird eine Infektion mit Humanen Papillomaviren als notwendige Ursache für die zervikale Karzinogenese und die Entstehung des Zervixkarzinoms angesehen. Für das untersuchte Patientenkollektiv ist dieser Zusammenhang ebenfalls sehr wahrscheinlich.

4.3 Altersabhängigkeit der HPV-Infektion

Die Infektion mit Humanen Papillomaviren zeigt eine eindeutige Abhängigkeit zum Alter der betroffenen Frauen. In der vorliegenden Arbeit sind junge Frauen im Alter

unter 30 Jahren signifikant häufiger mit HR-HPV infiziert als Frauen über 30 Jahre ($p=0.013$) (3.1.4).

Clavel et al. beschreiben in einer großen Studie für die dritte Lebensdekade die höchste Prävalenz von HR-HPV und einen kontinuierlichen Abfall derselben nach dem 30. Lebensjahr (24). *Jacobs et al.* berichten für die Altersgruppe von 25-29 Jahren den höchsten Anteil an HPV-Infektionen (52).

Ho et al. untersuchten eine Kohorte von 608 Studentinnen im Alter von 17-23 Jahren. Die initiale HPV-Prävalenz der jungen Frauen betrug 26%, die kumulative Inzidenz einer HPV-Infektion über 36 Monate wurde mit 43% angegeben. Die mediane Dauer einer neu erworbenen HPV-Infektion betrug dabei 8 Monate (95% KI: 7-10 Monate). 80% der Infektionen bildeten sich spontan zurück (49).

Die Ergebnisse anderer Autoren bestätigen das signifikant höhere Aufkommen von HPV-Infektionen unter jungen Frauen (20;45;71). Für das Alter von 15-19 Jahren ermittelten *Woodman et al.* in einer aktuellen englischen Studie eine HPV-Prävalenz von 12%. Bei initial negativem Befund von Zytologie und HPV-Test betrug das kumulative Risiko einer HPV-Infektion 44% für einen Zeitraum von 3 Jahren (116).

Die Daten zum Hybrid Capture Test II zeigen für die jungen Patientinnen unter 30 Jahren eine HR-HPV-Prävalenz von 49%, bei den älteren Frauen über 30 Jahre sind 37% der Fälle positiv für HR-HPV (3.1.4). In beiden Altersgruppen sind die HPV-Prävalenzen deutlich höher als in den angeführten Studien, allerdings beziehen sich die Ergebnisse der anderen Autoren entweder auf Patientenkollektive der Routinevorsorge (20;24;49;71) oder auf HPV-Testungen an unauffälligen Zytologie-Präparaten (45;52).

4.4 HPV-Nachweis zur Früherkennung des Zervixkarzinoms

Nachfolgend soll der Stellenwert des HPV-Nachweises mittels Hybrid Capture Test für die einzelnen zytologischen Befundgruppen dargestellt werden. Die Bewertung der Zytologie erfolgt hierbei nach der Münchener Nomenklatur II der Deutschen Gesellschaft für Zytologie (s. Anhang IV).

In der Diskussion und Interpretation der Ergebnisse muß zudem die sog. Bethesda-Klassifikation hinzugezogen werden, die in den mehrheitlich anglo-amerikanischen

Studien und Literaturstellen Verwendung findet (62). Die Bethesda-Klassifikation teilt die Befunde der Zytologie in zwei Risikogruppen. Die Gruppe mit niedrigem Risiko (low-grade squamous intraepithelial lesion, LGSIL) umfaßt kondylomatöse und koilozytische Läsionen sowie leichte Dysplasien, die Gruppe mit hohem Risiko (high-grade squamous intraepithelial lesion, HGSIL) enthält mäßige und schwere Dysplasien sowie in-situ-Karzinome (65) (s. Anhang V).

Der zytologische Befund PAP II beschreibt ein entzündlich oder degenerativ verändertes Zellbild. Von 194 Patientinnen mit der Diagnose PAP II wurden 16% positiv für HR-HPV getestet, unter 13 ausgewerteten HR-HPV-positiven Histologien fanden sich drei höhergradige Dysplasien (CIN III) sowie neun Histologien ohne pathologischen Befund.

Aus den vorliegenden Daten lässt sich demnach kein eindeutiger Nutzen für die zusätzliche Durchführung eines HPV-Tests bei Abstrichen ohne Anhalt für dysplastische Veränderungen herleiten. Insbesondere der Anteil falsch-positiver Ergebnisse der Hybrid Capture Methode wird in der Literatur kritisch herausgestellt.

Schneider et al. weisen darauf hin, dass Frauen mit negativer Zytologie in der Vorsorge durch einen positiven HR-HPV-Befund belastet werden und dass gegenwärtig keine Methode zur Behandlung asymptomatischer HPV-Infektionen verfügbar ist (94). *Kreienberg* betont vor diesem Hintergrund, dass die Spezifität einer Methode der Früherkennung ausreichend hoch sein muss und falsch-positive Testergebnisse bei seltenen Erkrankungen wie dem Zervixkarzinom ein besonderes Problem darstellen (60).

In einer aktuellen Studie von *Castle et al.* wurde hingegen die Bedeutung des einzelnen positiven HR- HPV-Tests bei unauffälliger Zytologie an 2000 Patientinnen der allgemeinen Vorsorge über einen Zeitraum von 5 Jahren untersucht (21). Der positive prädiktive Wert für die Entwicklung einer zytomorphologischen Veränderung im Sinne von ASCUS oder höher wurde dabei mit 15% berechnet. Beim Zusammentreffen von normaler Zytologie und positivem HPV-Test sollte sich die betroffene Patientin daher in jedem Fall der regelmäßigen Vorsorge unterziehen.

Mit Hinsicht auf die mediane Dauer einer HR-HPV- Infektion von 13.5 Monaten (41) empfehlen *Bory et al.* halbjährliche Kontrollen für Patientinnen mit normalem Abstrich und positivem HR-HPV-Test. Die Autoren konnten in einer Untersuchung an über 3000

Patientinnen mit unauffälliger Zytologie die signifikante Assoziation von persistierender HR-HPV-Infektion und der Entwicklung höhergradiger Dysplasien (HGSIL) belegen (13).

Die zytologischen Befunde PAP IIk und PAP III stellen Abstriche unklarer Dignität dar. Aufgrund schwerer entzündlicher oder degenerativer Veränderungen ist die eindeutige Bewertung und Einordnung des Zellbildes nicht möglich.

In der PAP-Gruppe IIk wurden mittels Hybrid Capture II 29% der Patientinnen positiv für HR-HPV getestet, acht HR-HPV-positive Histologien zeigten zwei höhergradige Dysplasien (CIN II-III), bei Negativität für HR-HPV war der histologische Befund stets unauffällig. Bei PAP III waren 47% der Fälle positiv für HR-HPV, neun HR-HPV-positive Histologien zeigten fünf höhergradige Dysplasien (CIN II-III), bei negativem HR-HPV-Status blieben die Histologien ebenfalls ohne pathologischen Befund.

Für die Erkennung höhergradiger Dysplasien innerhalb der PAP-Gruppen IIk und III werden Sensitivität und Negativer Prädiktiver Wert des Hybrid Capture Test II aus den vorliegenden Daten mit 99.3% und 99.7% berechnet ($p < 0.05$). Die zusätzliche Durchführung des HPV-Tests ist demnach eine nützliche und diagnostisch wegweisende Methode zur Triage von Frauen mit zytologischen Befunden unklarer Dignität.

Solomon et al. (ALTS Group/ Bethesda) untersuchten in einer großen randomisierten Studie verschiedene Strategien zur Abklärung zytologisch unsicherer Befunde. In der Erkennung höhergradiger Dysplasien bei Patientinnen mit der zytologischen Diagnose ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance) war der HPV-Nachweis der zytologischen Untersuchung eindeutig überlegen. Sensitivität und Negativer Prädiktiver Wert des Hybrid Capture Test wurden in dieser Studie mit 96.3% bzw. 99.5% für die Erkennung von CIN III und mit 95.9% bzw. 98.9% für die Erkennung von CIN II berechnet (101).

Die außerordentliche Bedeutung einer zuverlässigen Triage zytologisch unklarer Befunde konnten *Manos und Kinney et al.* in einer Untersuchung an 46.000 Patientinnen der allgemeinen Vorsorge herausstellen. Mit 3.6% der Fälle war ASCUS der häufigste abnormale zytologische Befund, 38.8% der gesicherten höhergradigen Dysplasien fanden sich bei Frauen mit der Diagnose ASCUS (57). Innerhalb dieses Kollektivs zeigte der HPV-Nachweis mit dem Hybrid Capture Test II eine Sensitivität von 89.2% für die Er-

kennung höhergradiger Dysplasien, der wiederholte zytologische Abstrich hatte dagegen eine Sensitivität von 76.2%. Der HPV-Nachweis wurde dabei in dieser Studie als „Reflex-HPV-Test“ an residuellen Proben durchgeführt, also ausschließlich bei Vorliegen eines auffälligen zytologischen Befundes (66).

Der zytologische Befund PAP IIID enthält Zellen einer leichten bis mäßigen Dysplasie, in der Bethesda-Klassifikation werden Zellen einer leichten Dysplasie als low-grade squamous intraepithelial lesion (LGSIL) bezeichnet.

Bei Vorliegen eines PAP IIID ist die Progressionstendenz zur höhergradigen Dysplasie zunächst unklar. Innerhalb dieser Gruppe wurden mit Hybrid Capture II 72% aller Frauen positiv für HR-HPV getestet, unter 43 ausgewerteten HR-HPV-positiven Histologien fanden sich 12 CIN III, 6 CIN II, 8 CIN I und 17 negative Histologien. Auffällig sind mithin die hohe Prävalenz von HR-HPV bei der Diagnose PAP IIID und ein Anteil an höhergradigen Dysplasien (CIN II/ III) von 42%. Für die Erkennung höhergradiger Dysplasien innerhalb der PAP-Gruppe IIID werden Sensitivität und Negativer Prädiktwert des Hybrid Capture Test II aus den vorliegenden Daten mit 94.7% und 91.7% berechnet ($p < 0.05$).

Die *ALTS Group/ Bethesda* (107) hat in diesem Zusammenhang 642 Frauen mit der zytologischen Diagnose LGSIL untersucht. Aufgrund einer HR-HPV- Prävalenz von 82.9% weisen die Autoren auf eine begrenzte Aussagekraft des HPV- Nachweises mittels HC II für das weitere diagnostische Vorgehen bei LGSIL hin.

In einer prospektiven Studie von *Nobbenhuis et al.* (78) war der Entwicklung einer höhergradigen Dysplasie (CIN III) in 95% der Fälle eine persistierende Infektion mit HR-HPV vorausgegangen. Die Autoren belegen, dass bei Frauen mit leichter bis mäßiger Dysplasie ein erneuter positiver HPV-Test die Progression zu CIN III besser vorhersagen konnte als die Wiederholung der Zytologie.

Eine Studie von *Petry et al.* (83) untersuchte ebenfalls den Stellenwert des HPV-Nachweises bei Patientinnen mit der zytologischen Diagnose einer leichten bis mäßigen Dysplasie. Der HPV-Test mittels Hybrid Capture II konnte dabei den klinischen Verlauf dieser Dysplasiegrade vorhersagen. Sämtliche Läsionen mit einer Progression zu CIN III waren dabei positiv für HR-HPV, bei Negativität für HR-HPV kam es in keinem Fall

zu einer Entwicklung von CIN III. Der Negative Prädiktive Wert des HCT II für die Inzidenz von CIN III wurde demnach mit 100% angegeben.

Zusammenfassend hat der einzelne HPV-Test für die PAP-Gruppe IIID nur dann einen diagnostischen Wert, wenn dieser negativ ausfällt. Die Wiederholung des HPV-Nachweises gibt dagegen möglicherweise Aufschluß über die Progressionstendenz einer HR-HPV-positiven Läsion.

Die PAP-Gruppe IVA zeigte eine HR-HPV-Prävalenz von 93%. Unter 38 HR-HPV-positiven Histologien fanden sich 33 höhergradige Dysplasien und Karzinome. PAP-Gruppe IVB war zu 100% positiv für HR-HPV, die ausgewerteten HR-HPV-positiven Histologien zeigten ausschließlich höhergradige Dysplasien (CIN II-III).

Bei Vorliegen eines zytologischen Befundes der PAP-Gruppe IV A oder IV B erfolgt in jedem Fall eine histologische Abklärung. Die HPV-Testung liefert dabei keinen wegweisenden Befund.

Die zytologische Diagnose PAP V muß ebenfalls histologisch geklärt werden. Aufgrund der hohen HR-HPV-Prävalenz dieser Läsionen steht die HPV-Testung hier gleichermaßen im Hintergrund.

Wider Erwarten sind in der vorliegenden Arbeit nur 77% der PAP V-Abstriche positiv für HR-HPV (3.1.2). Unter 8 HR-HPV-positiven Histologien fanden sich 3 Plattenepithelkarzinome und 4 schwere Dysplasien (CIN III). Das Absinken der HR-HPV-Prävalenz in der PAP-Gruppe V lässt sich vor allem durch die Materialentnahme an manifesten Zervixkarzinomen erklären: Abstriche von nekrotisch zerfallenen Portio-Arealen liefern dabei Zellen, die keine HPV-DNA mehr enthalten.

In der Auswertung der einzelnen zytologischen Befundgruppen und der zugehörigen histologischen Ergebnisse fanden sich in den PAP-Gruppen IIID und IVA falsch-negative Ergebnisse für die HPV-Testung mittels Hybrid Capture.

In der Gruppe PAP IIID war eine histologisch gesicherte höhergradige Dysplasie (CIN II) negativ für HR- HPV, in der Gruppe PAP IVA wurden zwei höhergradige Dysplasien (CIN II-III) und ein mikroinvasives Karzinom negativ für HR-HPV getestet.

Als Ursache für die Diskrepanz der Befunde kommt neben einer falschen oder ungenügenden Materialentnahme die im Einzelfall zu hohe Nachweisgrenze des Hybridisierungsassays von 1pg HPV- DNA/ml in Betracht. Zum anderen kann einer zervikalen Läsion ein HPV-Genotyp zu-grundeliegen, der nicht im Spektrum der high-risk-Sonde von Hybrid Capture II (HPV 16/ 18/ 31/ 33/ 35/ 39/ 45/ 51/ 52/ 56/ 58/ 59/ 68) enthalten ist.

Insgesamt zeigt die statistische Analyse des Hybrid Capture Test II einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen positivem Testergebnis für HR-HPV und pathologischem Histologiebefund ($p < 0.001$). Für die Erkennung höhergradiger Dysplasien und Karzinome wird die Sensitivität des Hybrid Capture II mit 94.7%, die Spezifität mit 60.7%, der Positive Prädiktive Wert (PPV) mit 63.1% und der Negative Prädiktive Wert (NPV) mit 94.2% berechnet. Für die Zytologie im Vergleich beträgt die Sensitivität 86.5%, die Spezifität 67.3%, der PPV 64.6% und der NPV 87.8%.

Die Validität der Zytologie wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Die in der vorliegenden Arbeit berechnete Sensitivität von 86.5% erscheint hoch im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Autoren.

Reid et al. (88) fanden 1991 eine Sensitivität von 52.2% für die Erkennung höhergradiger Dysplasien (HGSIL), *Cox et al.* beschrieben 1995 eine Sensitivität von 73% für den Nachweis von CIN II und III (27).

In der sog. Jena- Studie von *Schneider et al.* aus dem Jahr 2000 wurde die Sensitivität der Zytologie mit 18.4% berechnet (93). Zudem ergab eine Untersuchung von *Cuzick et al.* (31) zur Routinevorsorge von 2000 Patientinnen bei 44% aller CIN II/ III-Läsionen einen unauffälligen und demnach falsch-negativen zytologischen Befund.

Vor diesem Hintergrund wird in der Diskussion zur Verbesserung der Früherkennungsergebnisse beim Zervixkarzinom der Nachweis von HPV besonders herausgestellt. Die Hybrid Capture Methode zeichnet sich dabei durch eine sehr hohe Sensitivität für höhergradige Dysplasien aus und liefert einen hohen Negativen Prädiktiven Wert (NPV).

Eine aktuelle Studie aus Frankreich von *Clavel et al.* beschreibt an einem Kollektiv von 7932 Frauen für den Hybrid Capture II eine Sensitivität von 100% in der Erkennung höhergradiger Dysplasien (HGSIL). Angesichts einer Sensitivität der konventionellen Zytologie von 68.1% weisen die Autoren darauf hin, dass eine Kombination beider Methoden im Primärscreening die Erkennung von HGSIL signifikant verbessern würde (24).

Die bereits zur HPV-Prävalenz angeführte deutsche Studie von *Iftner et al.* aus Tübingen untersucht ebenfalls die Fragestellung, ob das Screening auf HR-HPV zusätzlich zur Zytologie die Sensitivität für die Früherkennung höhergradiger Dysplasien (CIN II/III) steigern kann (Abstract) (17). In der Detektion von CIN II und III erreichten Zytologie und Hybrid Capture II eine Sensitivität von 32% bzw. 94%, bei CIN III erkannte die Zytologie 50% der Fälle, 100% der Tests auf HR-HPV waren positiv. Die Spezifitäten von Zytologie und Hybrid Capture II wurden dabei mit 97% bzw. 94% berechnet. Die Autoren sind der Auffassung, dass die gegenwärtige Zervixkarzinom-Vorsorge in Deutschland mit dem alleinigen PAP-Abstrich keine ausreichende Sicherheit bietet und deuten dabei auf die zusätzliche Einführung der sensitiveren und weniger fehleranfälligen Testung auf HR-HPV mittels Hybrid Capture.

Die bislang als Abstract vorliegenden präliminären Daten der Tübinger Studie erscheinen wegweisend. Dennoch sollte erst nach vollständiger Publikation der Daten der Stellenwert des Hybrid Capture Test für das HPV-Screening abschließend beurteilt werden.

In der sog. Seattle-Studie von *Kulasingham et al.* wurden 3293 junge Frauen mit einem Durchschnittsalter von 24 Jahren untersucht (Abstract) (17). In der Erkennung von CIN II/III berechnen die Autoren für Zytologie und Hybrid Capture II eine Sensitivität von 56% bzw. 68%, die Spezifitäten der Methoden betragen 93% bzw. 79%. Die Autoren machen deutlich, dass bei vergleichbarer Sensitivität und Spezifität die HPV-Testung für das Screening in Betracht gezogen werden sollte.

Des Weiteren zeigt eine kanadische Multicenter-Studie von *Ratnam und Franco et al.* für den Hybrid Capture II eine Sensitivität von 90% für HGSIL bei einer Spezifität von 51% (87). Die Kombination von Zytologie und HCT II ergab hierbei einen Negativen Prädiktiven Wert von 100% für die Entwicklung einer HGSIL. Die Autoren bekräftigen,

dass eine Verbindung von Zytologie und HPV-Nachweis die Effektivität und Sicherheit des primären Screenings verbessern und Screeningintervalle verlängern kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichbare statistische Maßzahlen für den Hybrid Capture Test II aus dem Patientenkollektiv der Universitätsfrauenklinik Münster ermittelt. Aufgrund der dargestellten Datenlage erscheint eine Ergänzung der konventionellen Krebsvorsorge durch den HPV-Nachweis mittels Hybrid Capture sinnvoll.

4.5 Immunhistochemie

Neben der Hybrid Capture Methode wurde in der vorliegenden Arbeit die Immunhistochemie als weiteres HPV-Nachweisverfahren untersucht (3.1.6).

Die statistische Analyse der Daten zeigt einen signifikanten Zusammenhang ($p < 0.05$, Exakter Test nach Fisher) zwischen positiver Immunhistochemie und pathologischem Histologiebefund (CIN I-III, mikroinvasives Karzinom, Plattenepithelkarzinom).

Vergleicht man Hybrid Capture II und Immunhistochemie, so wird mit der immunhistochemischen Färbung das L1-Kapsid-Protein von HPV und mit HC II die HPV-DNA infizierter Zellen nachgewiesen. Demnach ist ein positiver Befund in der Immunhistochemie abhängig vom viralen Replikationszyklus und der Präsenz von L1-Kapsid-Protein, während mit HC II die HPV-DNA ab einem Schwellenwert von 1 pg/ml zu jedem Zeitpunkt erkannt wird. Die unterschiedlichen Testansätze erklären die statistischen Maßzahlen beider HPV-Nachweisverfahren. Mit einer diagnostischen Sensitivität von 35.6% und einem Negativen Prädiktiven Wert von 32.1% erscheint die Immunhistochemie als HPV-Nachweisverfahren ungeeignet.

4.6 Progressionsmarker zervikaler Läsionen

Leichtgradige Dysplasien und CIN I der Cervix uteri zeigen innerhalb der Nachsorge eine Rückbildungstendenz in bis zu 70% der Fälle (38;77;79;106). Patientinnen mit dieser Diagnose müssen zeitnah und regelmäßig kontrolliert werden, was eine psychische Belastung darstellt und Kosten verursacht. An dieser Stelle wären Parameter von Nutzen, die die Progressionstendenz einer CIN I-Läsion schon bei Erstdiagnose festlegen.

Unter der Vorstellung, dass der Dysplasiegrad einer Läsion von der Menge an HR-HPV-DNA (gemessen in Relative Light Units) abhängt, wurden in der vorliegenden Untersuchung die RLU-Werte mit den histologischen Befunden korreliert (3.1.7).

Wie in anderen Studien (23-26;106) konnte auch hier kein klinisch verwertbarer quantitativer Zusammenhang zwischen HPV-DNA-Menge (RLU) und Dysplasiegrad ermittelt werden. Insbesondere die fehlende Standardisierung und Quantifizierung der Materialentnahme für den HCT II liefert bei jedem Abstrich eine unterschiedliche Menge an Zellen. Damit variieren DNA-Menge und Signalintensität von Abstrich zu Abstrich. Des Weiteren umfasst die HR-Sonde des HC II eine Gruppe von 13 HR-HPV-Typen, so dass im einzelnen Testansatz die gemessene HPV-DNA aus einem Virustyp oder einer Mischinfektion resultieren kann (24).

Sun et al. belegen in ihrer Studie (105), dass aufwendige Laborschritte mit DNA-Extraktion und DNA-Quantifizierung notwendig sind, um mit Hybrid Capture II quantitative Aussagen zur Beziehung von HPV-DNA-Menge und zervikaler Dysplasie machen zu können.

In einer aktuellen Untersuchung zum HCT II verwenden *Lorincz et al.* (64) die RLU-Quotienten zur Beurteilung der HR-HPV-DNA-Menge. Eine Beziehung zwischen Virusload und der Entwicklung von CIN III war dabei nicht ersichtlich.

PCR-basierte Verfahren dagegen erlauben vor diesem Hintergrund quantitative Aussagen. So konnten *Josefsson und Ylitalo et al.* in einer skandinavischen Fall-Kontroll-Studie (54;118) zeigen, dass die durch PCR in zervikalen Läsionen ermittelte Menge an HPV-16-DNA mit einem bis zu 60fach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer CIN III assoziiert ist. Die Autoren nehmen an, dass die Quantifizierung von HPV-16-DNA Läsionen mit hohem und niedrigem Progressionspotential differenzieren kann.

4.7 Vergleich von Hybrid Capture Test I und II

Vor der Einführung des Hybrid Capture Test II wurde im Zytologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Münster die erste Version des Hybridisierungsassays nach der Hybrid Capture I-Methode verwendet.

Der Vergleich beider HPV-Nachweismethoden ergibt für den HC II eine Sensitivität von 94.7% und eine Spezifität von 60.7% in der Erkennung höhergradiger Dysplasien

und Karzinome. Für den HC I wurden eine Sensitivität von 70.0% und eine Spezifität von 71.4% berechnet (3.2.5).

Die erste Version des Hybrid Capture Tests findet auch in aktuellen Studien weiterhin Anwendung, entweder als alleiniges HPV-Nachweisverfahren oder im direkten Vergleich zum Hybrid Capture II.

Schiffman et al. (90) ermitteln dabei für den HC I eine Sensitivität von 74.8% und eine Spezifität von 93.4%, für den HC II 88.4% bzw. 89.0%. *Lorenzato et al.* (63) fanden für den HC I eine Sensitivität von 82.9% und eine Spezifität von 41.4%. Weitere Studien bestätigen die niedrigere Sensitivität des HC I im Vergleich zum HC II (61;74). Lediglich *Mould et al.* beschrieben eine Sensitivität des HC I von 90% in der Erkennung höhergradiger Dysplasien, wobei dieser Wert auf 70% sank, wenn die Sensitivität für alle Dysplasiegrade berechnet wurde (75).

Mit der Etablierung der Hybrid Capture Methode im Jahre 1995 wurden eine Reihe von Untersuchungen zur Bewertung des neuartigen HPV-Nachweises durchgeführt (40;43;117). Die Sensitivität für die Erkennung HPV-assoziiertes höhergradiger Dysplasien reichte dabei von 50% bei *Schneider et al.* (95) bis zu 93% bei *Cox et al.* (27). Nach Einführung der neueren Testversion im Jahre 1998 wurde durch Studien von *Clavel et al.* (26) und *Cuzick et al.* (30) deutlich, dass HC II in der Diagnostik zervikaler Dysplasien überlegen ist, denn jetzt konnte eine Sensitivität von über 90% erreicht werden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen den eindeutigen Gewinn an Sensitivität beim Hybrid Capture Test II in einen praktisch verwertbaren Bereich hinein (> 90%) bei nur 11% Verlust an Spezifität. Die neue Testversion ist demnach wesentlich geeigneter für die Diagnostik HPV-assoziiertes zervikaler Dysplasien. Maßgebliche Ursachen für die Steigerung der Sensitivität gegenüber dem Hybrid Capture Test I sind zum einen die Absenkung der HPV-Nachweisgrenze von 10.0 auf 1.0 pg DNA/ml, zum anderen die Erweiterung der Hochrisiko-Sonde von 9 auf 13 detektierbare HR-HPV-Typen (85).

4.8 Schlussfolgerung

Gegenstand der Arbeit ist der Hybrid Capture Test zum Nachweis von DNA Humaner Papillomaviren in der Früherkennung des Zervixkarzinoms. Der Stellenwert der Methode wurde an einem Risikokollektiv von 664 Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Münster mit hoher HPV-Prävalenz geprüft. Die erhobenen Daten beweisen den klinischen Nutzen der Methode und legen wie andere aktuelle Arbeiten eine Änderung der Krebsvorsorge unter Einbeziehung des HPV-Tests nahe.

Festzuhalten ist, dass der Hybrid Capture Test II der älteren Methode Hybrid Capture I mit einer diagnostischen Sensitivität von über 90% in der Erkennung zervikaler Dysplasien überlegen ist.

In der Triage von Patientinnen mit zytologischen Befunden unklarer Dignität erweist sich Hybrid Capture II als klinisch wegweisende Methode. Für die PAP-Gruppen IIk und III (ASCUS) werden Sensitivität und NPV für die Erkennung höhergradiger Dysplasien mit 99.3% bzw. 99.7% berechnet.

Zytologische Befunde mit unklarer Progressionstendenz (PAP IIID, LGSIL) können durch Hybrid Capture II besser eingeschätzt werden. Der Negative Vorhersagewert wird mit 91.7% berechnet, in der Literatur werden höhere Werte bis 100% angegeben.

Schließlich können für den Hybrid Capture Test II eine Sensitivität von 94.7% und ein NPV von 94.2% in der Erkennung höhergradiger Dysplasien (HGSIL) und Karzinome berechnet werden. Für die Zytologie werden Sensitivität und NPV mit 86.5% und 87.8% berechnet. Die Hybrid Capture Methode ist der Zytologie demnach eindeutig überlegen. Diese Daten weisen darauf hin, dass mit einer gleichzeitigen Anwendung von HPV-Test und Zytologie die Ergebnisse der Krebsfrüherkennung verbessert werden könnten.

Im Vergleich zur verfügbaren HPV-Literatur nehmen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientinnen als spezielles Kollektiv der Universitätsfrauenklinik eine Ausnahmestellung ein, denn die Mehrzahl der zum HPV-Test veröffentlichten Arbeiten entnehmen ihre Daten aus Kollektiven der allgemeinen Routinevorsorge.

Die hier retrospektiv erhobenen Daten deuten zwar ebenfalls auf den großen Nutzen der Hybrid Capture Methode in der Krebsfrüherkennung, für eine endgültige und abschließende Stellungnahme zur Integration des HPV-Tests in die bisherige zytologische Krebsvorsorge müssen jedoch zweifellos die Ergebnisse der noch offenen prospektiven Studien zum primären HPV-Screening abgewartet werden.

5 Literaturverzeichnis

- (1) IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks of Humans: Human Papillomaviruses. IARC, Lyon 1995; 64.
- (2) Statistisches Bundesamt. Gesundheitsbericht für Deutschland/ Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Stuttgart: Metzler Poeschel 1998.
- (3) Kassenärztliche Bundesvereinigung. Beteiligung an den Früherkennungsuntersuchungen in der GKV seit 1972. Grunddaten zur vertragsärztlichen Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland. Fachbereich Bedarfsplanung und Bundesarztregister. www.kbv.de 1999.
- (4) Jahresbericht Krebsregister Saarland 1996/97. Epidemiologisches Krebsregister Saarland Ministerium für Frauen, Arbeit und Soziales, Saarland 2000.
- (5) Fields Virology. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia (USA) 2001; Volume 1 (Fourth Edition).
- (6) Gemeinsames Krebsregister der Länder Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und der Freistaaten Sachsen und Thüringen. Sonderbericht: Das Gemeinsame Krebsregister 1995-1999. Schriftenreihe des GKR 4/2001 Medialis Druck, Berlin 2001.
- (7) Hybrid Capture Technology, Clinician Information, www.digene.com, 2003.
- (8) Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 3 erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken 2002.
- (9) Atkin NB. Chromosome 1 aberrations in cancer. Cancer Genet Cytogenet 1986; 21:279-285.
- (10) Atkin NB, Baker MC, Fox MF. Chromosome changes in 43 carcinomas of the cervix uteri. Cancer Genet Cytogenet 1990; 44(2):229-241.
- (11) Baltzer J. Zervixkarzinom - Diagnostische Verfahren und Therapie der Früh- und Vorstadien. Onkologe 2001; 7:827-841.
- (12) Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. Sex Transm Dis 1993; 20:274-278.

- (13) Bory JP, Cucherousset J, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P et al. Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3.091 women. *Int J Cancer* 2002; 102:519-525.
- (14) Bosch FX, Lorincz A, Munoz N. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55:244-265.
- (15) Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(11):796-802.
- (16) Bosch FX, Munoz N, de Sanjose S, Navarro C, Moreo P, Ascunce N et al. Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade III/ carcinoma in situ: a case-control study in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2(5):415-422.
- (17) Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsague X et al. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol* 2001; 54:163-175.
- (18) Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984; 3(5):1151-1157.
- (19) Braly P. Preventing cervical cancer. *Nat Med* 1996; 2:749-751.
- (20) Burk RD, Kelly P, Feldman J, Bromberg J, Vermund SH, Dehovitz JA et al. Declining Prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis* 1996; 23(4):333-341.
- (21) Castle PE, Wacholder S, Sherman M, Lorincz AT, Glass AG, Scott DR et al. Absolute risk of a subsequent abnormal Pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. *Cancer* 2002; 95:2145-2151.
- (22) Chung GT, Huang DP, Lo KW, Chan MK, Wong FW. Genetic lesion in the carcinogenesis of cervical cancer. *Anticancer Res* 1992; 12(5):1485-1490.

- (23) Clavel C, Masure M, Bory JP. Hybrid Capture II based human papilloma virus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions. A preliminary study on 1518 women. *Brit J Cancer* 1999; 80:1306-1311.
- (24) Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Brit J Cancer* 2001; 84(12):1616-1623.
- (25) Clavel C, Masure M, Levert M, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M et al. Human Papillomavirus Detection by the Hybrid Capture II Assay: A Reliable Test to Select Women With Normal Cervical Smears at Risk for Developing Cervical Lesions. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9(3):145-150.
- (26) Clavel C, Masure M, Putaud I, Thomas K, Bory JP, Gabriel R et al. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol* 1998; 51(10):737-740.
- (27) Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172(3):946-954.
- (28) Creasman WT. New gynaecologic cancer staging. *Gynaecol Oncol* 1995; 58:157-158.
- (29) Cullen AP, Reid R, Champion M, Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia. *J Virol* 1991; 65:606-612.
- (30) Cuzick J, Beverley E, Ho L, Terry G, Sapper H, Mielzynska I et al. HPV testing in primary screening of older women. *Br J Cancer* 1999; 81(3):554-558.
- (31) Cuzick J, Szarewski A, Terry G, Ho L, Hanby A, Maddox P et al. Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* 1995; 345(8964):1533-1536.
- (32) Cuzick J, Terry G, Ho L, Monaghan J, Lopes A, Clarkson P et al. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1* and DQB1* alleles and cervical cancer in British women. *Br J Cancer* 2000; 82(7):1348-1352.

- (33) de Sanjose S, Bosch FX, Munoz N. Social differences in sexual behaviour and cervical cancer. *IARC Sci Publ* 1997; 138:309-317.
- (34) Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991; 352(6338):824-827.
- (35) Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80(12):3812-3815.
- (36) Dürst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* 1992; 189:132-140.
- (37) Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243(4893):934-937.
- (38) Falls RK. Spontaneous resolution rate of grade 1 cervical intraepithelial neoplasia in a private practice population. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181(2):278-282.
- (39) Ferlay J, Pisani P, Parkin DM. *GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. Lyon, IARC press 2001.
- (40) Ferris DG, Wright TC, Litaker MS, Richart RM, Lorincz AT, Sun XW et al. Comparison of two tests for detecting carcinogenic HPV in women with Papanicolaou smear reports of ASCUS and LSIL. *J Fam Pract* 1998; 46(2):121-124.
- (41) Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180(5):1415-1423.
- (42) Hampton GM, Penny LA, Baergen RN, Larson A, Brewer C, Liao S et al. Loss of heterozygosity in cervical carcinoma: subchromosomal localization of a putative tumor-suppressor gene to chromosome 11q22-q24. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(15):6953-6957.

- (43) Hatch KD, Schneider A, Abdel-Nour MW. An evaluation of human papillomavirus testing for intermediate- and high-risk types as triage before colposcopy. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:1150-1155.
- (44) Hellberg D, Nilsson S, Gad A, Hongxiu J, Fuju C, Syrjanen S et al. Behavior of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) associated with various human papillomavirus (HPV) types. *Arch Gynecol Obstet* 1993; 252(3):119-128.
- (45) Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(6):464-474.
- (46) Hildesheim A, Gravitt P, Schiffman MH. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-income women in Washington, D.C. *Sex Transm Dis* 1993; 20:279-285.
- (47) Hilgarth M. Münchener Nomenklatur II für die gynäkologische Zytodiagnostik. Erläuterung und Befundwiedergabe. *Frauenarzt* 1998; 39(392).
- (48) Ho GY, Burk RD, Klein S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1365-1371.
- (49) Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338(7):423-428.
- (50) Horn LC, Kuhndel K, Bilek K. Histopathologic correlates of false-positive cytologic findings in the uterine cervix. *GebFra* 1995; 55(8):425-430.
- (51) Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJC, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 1995; 33:901-905.
- (52) Jacobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Verheijen RH, Franssen-Daalmeijer N et al. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer* 2000; 87(2):221-227.
- (53) Jones MH, Koi S, Fujimoto I, Hasumi K, Kato K, Nakamura Y. Allelotype of uterine cancer by analysis of RFLP and microsatellite polymorphisms: frequent

- loss of heterozygosity on chromosome arms 3q, 9q, 10q and 17q. *Genes Chromosom Cancer* 1994; 9:119-123.
- (54) Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Kragh Andersen P et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000; 355:2189-2193.
- (55) Kahl H, Hölling H, Kamtsiuris P. Inanspruchnahme von Früherkennungsuntersuchungen und Maßnahmen zur Gesundheitsförderung. *Gesundheitswesen* 1999; 61:163-168.
- (56) Karlsen F, Rabbitts PH, Sundresan V, Hagmar B. PCR-RFLP studies on chromosome 3p in formaldehyde-fixed, paraffin-embedded cervical cancer tissues. *Int J Cancer* 1994; 58:787-792.
- (57) Kinney WK, Manos MM, Hurley LB, Ransley JE. Where's the high-grade cervical neoplasia? The importance of minimally abnormal Papanicolaou diagnoses. *Obstet Gynecol* 1998; 91(6):973-976.
- (58) Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: Cytologic and pathologic study of koilocytic atypia. *Ann NY Acad Sci* 1956; 63(1245):1261.
- (59) Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327(18):1272-1278.
- (60) Kreienberg R. Früherkennung von Karzinomen der Zervix, Vulva, Vagina. *Onkologe* 2001; 7:893-896.
- (61) Kuhn L, Denny L, Pollack A, Lorincz A, Richart RM, Wright TC. Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in low-resource settings. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(10):818-825.
- (62) Kurman RJ, Solomon D. The Bethesda-System for reporting cervical/ vaginal cytologic diagnose: Definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. Springer, Berlin Heidelberg New York 1994.

- (63) Lorenzato F, Singer A, Mould T, Santos LC, Maia A, Cariri L. Cervical cancer detection by hybrid capture and evaluation of local risk factors. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 73(1):41-46.
- (64) Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002; 360(9328):228-229.
- (65) Löning T. Dysplasien und Neoplasien des Plattenepithels der Zervix. *Pathologie der weiblichen Genitalorgane III* Springer, Berlin Heidelberg New York 2001.
- (66) Manos MM, Kinney WK, Hurley LB, Sherman ME, Shieh-Ngai J, Kurman RJ et al. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA* 1999; 281(17):1605-1610.
- (67) Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7:209-213.
- (68) McDougall JK, zur Hausen H (ed.). *Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. Current Topics in Microbiology and Immunology* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1994; 86:101-119.
- (69) Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976; 20(6):505-509.
- (70) Meisels A, Roy M, Fortier M, Morin C, Casas-Cordero M, Shah KV et al. Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. *Acta Cytol* 1981; 25(1):7-16.
- (71) Melkert PW, Hopman E, van den Brule AJ, Risse EK, van Diest PJ, Bleker OP et al. Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* 1993; 53(6):919-923.
- (72) Milde-Langosch K, Riethdorf S, Park TW. Natürlicher Verlauf der HPV-Infektion - Nutzen der HPV-Analytik in der Zervixdiagnostik. *Pathologe* 1999; 20:15-24.
- (73) Mitra AB, Murty VV, Li RG, Pratap M, Luthra UK, Chaganti RS. Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54:4481-4487.

- (74) Morin C, Bairati I, Bouchard C, Fortier M, Roy M, Moore L et al. Managing atypical squamous cells of undetermined significance in Papanicolaou smears. *J Reprod Med* 2001; 46(9):799-805.
- (75) Mould TA, Singer A, Gallivan S. Quantitative detection of oncogenic HPV DNA using hybrid capture to triage borderline and mildly dyskaryotic Papanicolaou smears. *Eur J Gynaecol Oncol* 2000; 21(3):245-248.
- (76) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52(5):743-749.
- (77) Nasiell K, Roger V, Nasiell M. Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 1986; 67(5):665-669.
- (78) Nobbenhuis MAE, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EKJ et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354:20-25.
- (79) Östör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12(2):186-192.
- (80) Papanicolaou GN. A new procedure for staining vaginal smears. *Science* 1942; 95(438).
- (81) Park TW, Fujiwara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer* 1995; 76:1902-1913.
- (82) Park TW, Richart RM, Sun XW, Wright TC. Correlation between HPV type and clonal status of cervical squamous intraepithelial lesions (SIL). *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:355-358.
- (83) Petry KU, Böhmer G, Iftner T, Davies P, Brummer O, Kühnle H. Factors associated with an increased risk of prevalent and incident grade III cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer among women with Papanicolaou tests classified as grades I or II cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:28-34.
- (84) Peyton CL, Schiffman M, Lorincz AT, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C et al. Comparison of PCR- and Hybrid Capture-based Human Papillomavirus

- detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11):3248-3254.
- (85) Poljak M, Brencic A, Seme K, Vince A, Marin IJ. Comparative evaluation of first- and second-generation digene hybrid capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1999; 37(3):796-797.
- (86) Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6):1304-1310.
- (87) Ratnam S, Franco EL, Ferenczy A. Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(9):945-951.
- (88) Reid R, Greenberg MD, Lorincz A, Jenson AB, Lavery CR, Husain M et al. Should cervical cytologic testing be augmented by cervicography or human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection? *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:1461-1469.
- (89) Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 1973; 8:301-328.
- (90) Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA* 2000; 283(1):87-93.
- (91) Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:958-964.
- (92) Schneider A, Dürst M, Klug SJ, Kaufmann A, Jochmus I, Gissmann L. Epidemiologie, Ätiologie und Prävention des Zervixkarzinoms. *Onkologie* 2001; 7:814-826.
- (93) Schneider A, Hoyer H, Lotz B, Leistritz S, Kühne-Heid R, Nindl I et al. Screening for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 2000; 89:529-534.
- (94) Schneider A, Scheungraber C, Hoyer H, Dürst M. Früherkennung des Zervixkarzinoms: Zytologie oder HPV-Test? *Gynäkologie* 2002; 35:181-192.

- (95) Schneider A, Zahm DM, Kirchmayr R, Schneider VL. Screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: validity of cytologic study, cervicography and human papillomavirus detection. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174(5):1534-1541.
- (96) Schwartz SM, Weiss NS. Increased incidence of adenocarcinoma of the cervix in young women in the United States. *Am J Epidemiol* 1986; 124(1045):1047.
- (97) Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985; 314(6006):111-114.
- (98) Segers P, Haesen S, Amy JJ, De Sutter P, Van Dam P, Kirsch-Volders M. Detection of premalignant stages in cervical smears with a biotinylated probe for chromosome 1. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 75(2):120-129.
- (99) Sellors JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *CMAJ* 2000; 163(5):503-508.
- (100) Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990; 71:173-181.
- (101) Solomon D, Schiffman M, Tarone R, ALTS Study group. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: Baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4):293-299.
- (102) Soost HJ. Gynäkologische Zytodiagnostik: Lehrbuch und Atlas / von Hans-Jürgen Soost u. Siegfried Baur. Begr. von Horst Smolka u. Hans-Jürgen Soost. Stuttgart, New York: Thieme 1990; 5., überarb. u. erw. Aufl.
- (103) Sreekantaiah C, Bhargava MK, Shetty NJ. Chromosome 1 abnormalities in cervical carcinoma. *Cancer* 1988; 62(7):1317-1324.
- (104) Sreekantaiah C, De Braekeleer M, Haas O. Cytogenetic findings in cervical carcinoma. A statistical approach. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 53:75-81.

- (105) Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76(1):41-47.
- (106) Terry G, Ho L, Londesborough P, Cuzick J, Mielzynska-Lohnas I, Lorincz A. Detection of High-Risk HPV Types by the Hybrid Capture 2 Test. *J Med Virol* 2001; 65:155-162.
- (107) The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(5):397-402.
- (108) Turek LP. The structure, function and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv Viral Res* 1994; 44:305-356.
- (109) van den Brule AJ, Snijders PJ, Gordijn RL, Bleker OP, Meijer CJ, Walboomers JM. General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int J Cancer* 1990; 45(4):644-649.
- (110) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1):12-19.
- (111) Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 341:1633-1638.
- (112) Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248(4951):76-79.
- (113) Wheeler CM, Parmenter CA, Hunt WC. Determinants of genital human papillomavirus infection among cytologically normal women attending the University of New Mexico student health center. *Sex Transm Dis* 1993; 20:286-289.
- (114) Wittekind Ch, Wagner G. TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 5. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York 1997.

- (115) Wong YF, Wong FWS, Cheung TH, Fung HYM, Chung TKH, Lam SK et al. Frequent loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 1 in cervical carcinoma. *Med Sci Res* 1993; 24:891-892.
- (116) Woodman CBJ, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001; 357:1831-1836.
- (117) Wright TC, Sun XW, Koulos J. Comparison of management algorithms for the evaluation of women with low-grade cytologic abnormalities. *Obstet Gynecol* 1995; 85(2):202-210.
- (118) Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Pontén J et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000; 355:2194-2198.
- (119) Yokota J, Tsukada Y, Nakajima T, Gotoh M, Shimosato Y, Mori N et al. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1989; 49:3598-3601.
- (120) zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976; 36:530.
- (121) zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977; 78:1-30.
- (122) zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991; 184:9-13.
- (123) zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991; 254:1167-1173.
- (124) zur Hausen H. Disrupted dichotomous intracellular control of human papillomavirus infection in cancer of the cervix. *Lancet* 1994; 343:955-957.
- (125) zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186:131-156.
- (126) zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288:F55-F78.
- (127) zur Hausen H. Papillomviren als Krebserreger. *GebFra* 1998; 58:291-296.
- (128) zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations

with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974; 13(5):650-656.

Anhang

Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms nach FIGO/TNM (28;114)

TNM	Cervix uteri	FIGO
Tis	Carcinoma in situ	0
T1	Begrenzt auf Uterus	I
T1a	Diagnose nur durch Mikroskopie	IA
T1a1	Tiefe ≤ 3mm, horizontale Ausbreitung ≤ 7mm	IA1
T1a2	Tiefe 3–5mm, horizontale Ausbreitung ≤ 7mm	IA2
T1b	Klinisch sichtbar/nur mikroskopisch diagnostizierbar/größer als T1a2	IB
T1b1	≤ 4cm	IB1
T1b2	> 4cm	IB2
T2	Ausdehnung jenseits Uterus, aber nicht zur Beckenwand und nicht zum unteren Vaginaldrittel	II
T2a	Parametrien frei	IIA
T2b	Parametrien befallen	IIB
T3	Ausdehnung zum unteren Vaginaldrittel/Beckenwand/Hydronephrose	III
T3a	Unteres Vaginaldrittel	IIIA
T3b	Beckenwand/Hydronephrose	IIIB
T4	Schleimhaut von Harnblase/Rektum/jenseits kleinem Becken	IVA
M1	Fernmetastasen	IVB

Testablauf der Hybrid Capture Methode (7)



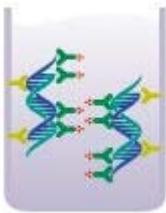
Denaturierung



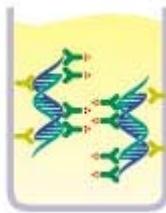
Hybridisierung



Bindung an Röhren



Detektion der Hybride



Signalentwicklung

Färbung nach Papanicolaou (102)

Die Papanicolaou-Färbung wird in folgender Weise durchgeführt (in Anlehnung an eine Veröffentlichung von Papanicolaou (80) aus dem Jahre 1942). Die 20-30 Minuten in 96%igem Äthylalkohol oder 99%igem Isopropylalkohol fixierten Ausstriche werden wie folgt weiterbehandelt:

1. 80%iger Alkohol (1/2 Minute)
2. 70%iger Alkohol (1/2 Minute)
3. 50%iger Alkohol (1/2 Minute)
4. Aqua dest. (1/2 Minute)
5. Hämatoxylin (Harris) (3-6 Minuten)
6. Aqua dest. (1/2 Minute)
7. 0.25%ige wässrige Salzsäure (6mal eintauchen)
8. fließendes Wasser (6 Minuten)
9. Aqua dest. (1/2 Minute)
10. 50%iger Alkohol (1/2 Minute)
11. 70%iger Alkohol (1/2 Minute)
12. 80%iger Alkohol (1/2 Minute)
13. 95%iger Alkohol (1/2 Minute)
14. Orange G6 (1 ½ Minuten)
15. 95%iger Alkohol (1/2 Minute)
16. 95%iger Alkohol (1/2 Minute)
17. EA 50 (1 ½ Minuten)
18. 95%iger Alkohol (1/2 Minute)
19. 95%iger Alkohol (1/2 Minute)
20. 95%iger Alkohol (1/2 Minute)
21. absoluter Alkohol (1/2 Minute)
22. Xylol-Alkohol (zu gleichen Teilen) (1/2 Minute)
23. Xylol (1/2 Minute)
24. eindecken in Caedax, Eukitt oder Kanadabalsam

Münchener Nomenklatur II (47)
Klassifikation zytologischer Befunde

- I Normales Zellbild, dem Alter entsprechend, einschließlich leichter entzündlicher und degenerativer Veränderungen sowie bakterieller Zytolyse.
- II Deutlich entzündliche Veränderungen an Zellen des Platten- u. zervikalen Zylinderepithels. Zellen aus Regenerationsepithel, unreife metaplastische Zellen, stärkere degenerative Zellveränderungen, Para- u. Hyperkeratosezellen.
Normale Endometriumzellen, auch nach der Menopause. Ferner spezielle Zellbilder wie folliculäre Zervizitis. Zellveränderungen bei IUP. Zeichen einer HPV-Infektion ohne wesentliche Kernveränderungen. Zeichen einer Herpes- od. Zytomegalievirusinfektion.
- IIID Zellen einer Dysplasie leichten bis mässigen Grades (Zeichen einer HPV-Infektion sollten besonders erwähnt werden).
- IVA Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ (Zeichen einer HPV-Infektion sollten besonders erwähnt werden).
- IVB Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ. Zellen eines invasiven Karzinoms nicht auszuschließen.
- V Zellen eines malignen Tumors
Zellen eines Plattenepithelkarzinoms (verhornend od. nicht verhornend).
Zellen eines Adenokarzinoms, möglichst mit Hinweis, ob endometrialen, endozervikalen oder extrauterinen Ursprungs.
Zellen sonstiger maligner Geschwülste.
- III Unklarer Befund: Schwere entzündliche, degenerative oder iatrogene Zellveränderungen, die eine sichere Beurteilung zwischen gut- u. bösartig nicht zulassen. Auffällige Zellen eines Drüsenepithels, deren Herkunft aus einem Karzinom nicht sicher auszuschliessen ist, möglichst mit Hinweis, ob die Zellen endometrialen, endozervikalen oder extrauterinen Ursprungs sind.

Bethesda-Klassifikation und Münchener Nomenklatur II (65)

Zytologischer Befund (in Anlehnung an München II)	Normales alterent- sprechendes Zellbild	Entzündliche reaktive, regenerative, degenerative, metaplastische Veränderung	Zeichen der HPV- Infektion	Zellen einer leichten Dysplasie	Zellen einer mäßigen Dysplasie	Zellen einer schweren Dysplasie/ Carcinoma in situ (Cis)	Zellen einer schweren Dysplasie/Cis, Zellen eines invasiven Karzinoms nicht auszuschließen	Zellen eines malignen Tumors	Unklarer Befund (schwere entzündliche, degenerative oder ietrogene Veränderungen, die eine sichere Beurteilung nicht zulassen)
MÜNCHEN II	I	II IIW	II	IIID	IIID	IVa	IVb	V	III
BETHESDA	negativ	negativ ASCUS AGUS	Low- grade SIL		High- grade SIL			Karzinom	

Abkürzungsverzeichnis

AdCa	Adenokarzinom
AP	Alkalische Phosphatase
ASCUS	Atypical squamous cells of undetermined significance
bp	Basenpaare
Cabr	Cervix-Abrasio
CIN	Cervikale intraepitheliae Neoplasie
CIS	Carcinoma in situ
Cur	Curretage
CV	Variationskoeffizient
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECC	Endocervikale Curretage
EGF	Epidermal growth factor
GKFP	Gesetzliches Krebsfrüherkennungsprogramm
HC	Hybrid Capture
HCT	Hybrid Capture Test
HGSIL	High-grade squamous intraepithelial lesion
HE	Hysterektomie
HPV	Humane Papillomaviren
HR-HPV	High-risk-HPV
IH	Immunhistochemie
K	Konisation
KI	Konfidenzintervall
LGSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion
LOH	Loss of heterozygosity
LR-HPV	Low-risk-HPV
mivCa	Mikroinvasives Karzinom
mRNA	messenger RNA
NC	Negativkontrolle
NPV	Negativer Prädiktiver Wert
ORF	Open reading frame

PAP-Abstrich	Abstrich nach Papanicolaou
PC	Positivkontrolle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Probe-Exzision
PE-Ca	Plattenepithel-Karzinom
pg	Picogramm
PPV	Positiver Prädiktiver Wert
Rb-Protein	Retinoblastoma-Protein
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
URR	Upstream regulatory region

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ralph J. Lellé für die Bereitstellung des Themas dieser Doktorarbeit. Den Abschluß meiner Dissertation verdanke ich in entscheidendem Maße der freundlichen, verbindlichen und stets zugewandten Betreuung durch Professor Lellé.

Ebenso dankbar verbunden bin ich Frau Dr. med. Elisabeth Maier, die meine Arbeit bis zu ihrem Wechsel nach München maßgeblich begleitet hat.

Großen Dank möchte ich auch den MTAs des Zytologischen Labors der Universitätsfrauenklinik Münster, Frau Birgit Konert und Frau Magdalena Marciniak, aussprechen. Sie haben die zytologischen Präparate hergestellt und die HPV-Tests durchgeführt.

Frau Dr. med. Elke Eltze aus dem Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie danke ich sehr für die Überlassung der Daten zur Histologie und Immunhistochemie.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. medic. R. J. Fischer aus dem Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik danke ich herzlich für die Anregungen zur statistischen Analyse und Auswertung der Daten.

