

Aus dem Pathologischen Institut
des Klinikums Osnabrück
Akademisches Lehrkrankenhaus der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Chefarzt Professor Dr. R. H. Krech

Papillomvirusinfektion der Cervix uteri

- Korrelation zur Cervixcytologie und zum Versichertenstatus -
- Eine Studie an 164 Patientinnen -

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

Der medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von:

Bernd Holthaus

aus

Georgsmarienhütte

2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Böcker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Krech

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2004

Aus dem Pathologischen Institut
des Klinikums Osnabrück
Akademisches Lehrkrankenhaus der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Chefarzt: Professor Dr. med. R. H. Krech
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Böcker
Koreferent: Prof. Dr. R. Krech

ZUSAMMENFASSUNG:

Papillomvirusinfektion der Cervix uteri

Korrelation zur Cervixcytologie und zum Versichertenstatus.

Eine Studie an 164 Patientinnen.

Bernd Holthaus

Das Cervixcarcinom ist nach dem Mammacarcinom, dem Ovarialcarcinom und dem Endometriumcarcinom das häufigste Genitalcarcinom der Frau. Die bisherige Krebsvorsorge bei der Frau konnte zu Beginn eine deutliche Abnahme des invasiven Cervixcarcinoms bewegen, wobei immer noch eine hohe Anzahl von Frauen, die an einem solchem Carcinom erkranken, regelmäßig an der Krebsvorsorge teilnehmen.

Die Infektion mit bestimmten humanen Papillomviren ist als Karzinogen mittlerweile akzeptiert. Deshalb stellt die HPV-Diagnostik eine zusätzliche Untersuchungsmethode dar, um die Cervixcytologie bei bestimmten Konstellationen in der Früherkennung von Dysplasien und Krebsvorstufen zu ergänzen und zu verbessern. Außerdem wird der Versichertenstatus mit dem HPV Status korreliert. Die Ergebnisse werden den Literaturdaten gegenübergestellt und kritisch diskutiert. In einem Fazit für die Praxis werden unter anderem Empfehlungen zum diagnostischem Vorgehen gegeben.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	3
1.1.	Aktualität des Untersuchungsthemas	3
1.2.	Das Ziel der Arbeit	5
2.	PATIENTENGUT UND METHODE	6
2.1.	Abstrichtechnik	6
2.2.	Papanicolaou Färbung	6
2.3.	Hybrid Capture II Test	13
2.4.	Statistische Methoden	17
2.5.	Patientengut	17
3.	ERGEBNISSE	19
3.1.	Zusammensetzung des Patientengutes und Bezug zum Versicherungsstatus der Patientin	19
3.2.	HPV Befund im Vergleich zum cytologischen Befund	21
3.3.	HPV High-risk Infektion bei unterschiedlichem Versichertenstatus	24
3.4.	PAP-Befund bei unterschiedlichem Versichertenstatus	28
3.5.	Histologie versus HPV Status	30
3.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse	33
4.	LITERATURÜBERSICHT MIT DISKUSSION	34
4.1.	Inzidenz und Epidemiologie des Cervixcarcinoms	34

4.2.	Die verschiedenen HPV Nachweisverfahren und ihre Praktikabilität	39
4.3.	Die Rolle der HPV-Infektion bei der Entstehung des Cervixcarcinoms	43
4.3.1.	Molekularbiologische Grundlagen der HPV Infektion	48
4.4.	Krebsvorsorge in Deutschland	53
4.4.1	Ist-Analyse	53
4.4.2	Trend der Krebsvorsorge unter Einbezug der HPV Testung	56
4.5.	Prävention durch HPV-Vakzinierung	58
5.	FAZIT FÜR DIE PRAXIS	60
6.	LITERATURVERZEICHNIS	63
7.	DANKSAGUNG	77
8.	LEBENS LAUF	78

1 Einleitung

1.1. Aktualität des Untersuchungsthemas

Weltweit erkranken jährlich etwa 450.000 bis 500.000 Frauen an einem Carcinom der Cervix Uteri. Rund 350.000 Frauen davon sterben an dieser Erkrankung [53].

Die Inzidenz liegt in Abhängigkeit von der geographischen Lage zwischen 5 und 48 Frauen pro 100.000, wobei Spanien die niedrigste Rate und Kolumbien die höchste Rate aufweisen. Da in Deutschland ein zentrales Krebsregister fehlt, wird die Zahl der Neuerkrankungen auf 7.000 pro Jahr geschätzt - dies entspricht einer Inzidenz des Cervixcarcinoms in Deutschland von ca. 11,5 pro 100.000, wobei es auch in Deutschland geographische Unterschiede gibt [77]. Die Anzahl von Patientinnen mit Präkanzerosen liegt ca. 100fach höher. Damit dürften pro Jahr ca. 300.000 Frauen in Deutschland an einer schweren Präkanzerose erkranken. Dies entspricht einer Inzidenz von ca. 1%.

Aufgrund dieser statistischen Vorgaben kommt der Erkennung und der Behandlung der Präkanzerosen eine wichtige Rolle zu.

Unter den vielen, sich erfolgreich entwickelten Richtungen der klinischen Onkologie nimmt das Problem der bösartigen Tumoren des Gebärmutterhalses und das Krebsvorsorgeprogramm zur Erkennung der Vorstufen eines invasiven Carcinoms eine besondere Stellung ein.

In Publikationen aus den 70er Jahren dominierte das invasive Cervixcarcinom die onkologische Morbiditätsstatistik. In den Folgejahren wurde eine deutliche Abnahme sowohl der Mortalitäts- als auch der Morbiditätsrate des Cervixcarcinoms in Industrienationen berichtet. Zwei Gründe mögen dafür ursächlich sein:

1. Die prophylaktischen Maßnahmen, unter welchen dem cytologischen Screening die größte Bedeutung beigemessen wird. Mit der 1971 in Deutschland eingeführten Krebsfrüherkennung bei der Frau konnte eine

deutliche Abnahme der Inzidenz des invasiven Cervixcarcinoms erreicht werden. Diese Veränderungen können auf die Früherkennung von präneoplastischen Läsionen durch die Cervixcytologie zurückgeführt werden. Die Aufdeckung der Dysplasie und des Carcinoma in situ durch Screeninguntersuchungen sowie deren rechtzeitige und adäquate Behandlung sind reale Maßnahmen der sekundären Prophylaxe des Cervixcarcinoms. Somit ist die Genitalcytologie durchaus als eine erfolgreiche Methode zur Krebsfrüherkennung anzusehen. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die einfache cytologische Untersuchung von Cervixabstrichen - je nach Studie - eine hohe Schwankungsbreite (5-50%) bei falsch negativen Befunden (Sensitivität) aufweist [14,30,69,79].

2. Viele andere Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie einen negativen Einfluß auf die Entstehung eines Cervixcarcinoms haben, sind kontrollierbar geworden. Beispielsweise kann die Aufnahme von Sexualkontakten auf einen späteren Lebenszeitpunkt verschoben werden, so weiß man, dass eine frühe Aufnahme von Sexualkontakten, das Entstehen des Cervixcarcinoms begünstigt. Die Senkung der Promiskuität, die Veränderung der Kontrazeption (Kondome wirken protektiv bezüglich einer HPV Infektion) und die Senkung des Nikotinabusus verringern die Inzidenz des Cervixcarcinoms. Als akzeptierte Risikofaktoren bei der Entstehung des Cervixcarcinoms gelten: Das Sexualverhalten, das Alter, der sozioökonomische Status, der Nikotinkonsum, die Einnahme oraler Kontrazeptiva und Zustände einer Immunsuppression [11]. Cofaktoren, wie das Rauchen oder andere sexualübertragbare Krankheiten können die Persistenz von HPV sowie die Progression zu einer Neoplasie erhöhen [50].

Der Canzerogenese des Cervixcarcinoms liegt ein modernes Konzept zugrunde, nach welcher ätiologisch dem humanen Papillomvirus (HPV) eine besondere Rolle zukommt[86]. Durch molekulare und epidemiologische Studien wurde bewiesen, dass verschiedene HPV-Typen ursächlich an der Entstehung des

Cervixcarcinoms beteiligt sind. Mittels Hybridisationstechnik wurde festgestellt, dass humane Papillomviren (HPV) in mehr als 94% der Fälle an der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt sind [8].

Manche Autoren zeigen, dass die Sensitivität der Cervixcytologie, die eine sehr einfache und effektive Untersuchungsmethode darstellt, durch eine additive HPV Untersuchung zu steigern ist [79]. Mit dem Hybrid Capture II Verfahren steht eine relativ kostengünstige Methode mit hoher Reproduzierbarkeit und einfachem „Handling“ zur Verfügung.

1.2. Das Ziel dieser Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist die Bestimmung der Korrelation zwischen einer HPV High-risk Infektion und der konventionellen cytologischen Abstrichuntersuchung nach Papanicolaeu sowie der Korrelation zwischen einer HPV High-risk Infektion und dem Versichertenstatus. Dadurch könnte der Versichertenstaus - als Teil der sozioökonomischen Faktoren - die Möglichkeit einer Risikoeinteilung eröffnen und somit die rechtzeitige Erkennung von Dysplasien unterstützen. Demzufolge könnte eine weitere Abnahme der Cervixcarcinominzidenz erreicht werden. Diese Arbeit hat 3 wichtige Zwecke:

1. Identifikation von Patientinnenkollektiven, die eine vermehrte medizinische Kontrolle in der Vorsorge zur Entdeckung HPV High-risk Infektion bedürfen, um so intraepitheliale Neoplasien frühzeitig erkennen zu können.
2. Evaluation der sozioökonomischen Faktoren, die ursächlich an der Entstehung des Cervixcarcinoms beteiligt sind und Vergleich der hier erhobenen Daten mit aktuellen Literaturangaben.
3. Gibt es Unterschiede in der Häufigkeit einer HPV High-risk Infektion und dem Versichertenstatus bei den Patienten.

2 Patientengut und Methode

2.1. Abstrichtechnik

Es wurden von 81.643 Patientinnen (Untersuchungsgut) diejenigen Fälle ausgewertet, bei denen bei auffälligen PAP-Befunden, auch eine HPV-Typisierung durchgeführt worden war.

Die Abstrichentnahme erfolgt im Zusammenhang mit der gynäkologischen Vorsorgeuntersuchung. Es wird -laut Hersteller des Hybrid Capture Test II (Digene) - empfohlen die Abstriche zur HPV-Diagnostik nach dem normalen PAP-Abstrich zu entnehmen, damit für den cytologischen Abstrich ausreichend Zellmaterial gewonnen werden kann. Unter kolposkopischer Sicht und auch bei der sogenannten erweiterten Kolposkopie (Essigprobe, Schiller Jodprobe) sollten sowohl der cytologische Abstrich als auch der HPV-Abstrich aus einem suspektem Bereich entnommen werden. Zur Gewinnung der Zellen werden Spatel, Bürste oder Watteträger verwendet. Für die HPV-Diagnostik wird das gewonnene Zellmaterial zusammen mit dem Entnahmeträger in die zum Test gehörende Pufferlösung gebracht und aufgeschwemmt, damit sich die Zellen lösen können. Das verwendete Spekulum sollte nicht mit Öl oder anderen Gleitmitteln versehen werden, sondern nur mit physiologischer Kochsalzlösung oder Wasser angefeuchtet werden.

2.2. Papanicolaou Färbung

Die Papanicolaou Färbung wird seit ca. 60 Jahren in fast unveränderter Form angewendet und ist an die Veröffentlichung aus dem Jahre 1942 angelehnt [56]. Die in 96%igem Äthylalkohol oder 99%igem Isopropylalkohol fixierten Ausstriche werden wie folgt weiterbehandelt, wobei ein Teil der Arbeitsschritte automatisiert durchgeführt wird.

Bei der Fixierung des cytologischen Abstriches mit einem Polyäthylenglukolspray können die beiden ersten Stufen der absteigenden Alkoholreihe wegfallen.

Nach Eingang im Labor werden die in Alkohol fixierten Präparate zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe geführt und in Aqua dest. gespült. Dies ist notwendig, weil Hämatoxylin eine wässrige Lösung ist. Hämatoxylin bewirkt die Kernfärbung. Die Differenzierung erfolgt dann mit wässriger Salzsäure und Spülen unter fließendem Wasser. Für den nächsten Färbungsschritt müssen die Präparate dehydriert werden, dies gelingt durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Nun schließt sich die Färbung mit Orange G 6 an. Nach Zwischenschaltung von Alkohol folgt der Färbeschritt mit dem Polychromfarbstoff EA 50. Diese beiden Farbstoffe dienen der Plasmafärbung. Anschließend werden alle Spuren von Wasser durch mehrfaches Spülen in hochprozentigem Alkohol extrahiert.

Die Papanicolaoufärbung zeichnet sich durch eine sehr distinkte, feine Zeichnung der Kerne und eine hohe Transparenz der Plasmafärbung aus, so dass auch bei den regelmäßig in den Abstrichen vorkommenden Überlagerungen, die Zellen gut zu erkennen und zu beurteilen sind. Das Cytoplasma der ausgereiften Zellen des Plattenepithels nimmt eine eosinophile, d.h. rosa bis hellrote Farbe an. Keratinisierte Zellen färben sich leuchtend orange bis gelblich. Das Cytoplasma von tiefer gelegenen Plattenepithel-, wie Parabasal- und Intermediärzellen färben sich zyanophil, d.h. hellblau bis grünlich. Die Kernkörperchen färben sich rötlich an. Unterschiedliche Diagnosegruppen sind in den Abb. 1 bis 4 dargestellt.

Die einzelnen Schritte der Papanicolaoufärbung sind im zeitlichem Ablauf in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Cytologie der Cervix uteri (Cytophotogramme)nach Papanicolaou gefärbt:

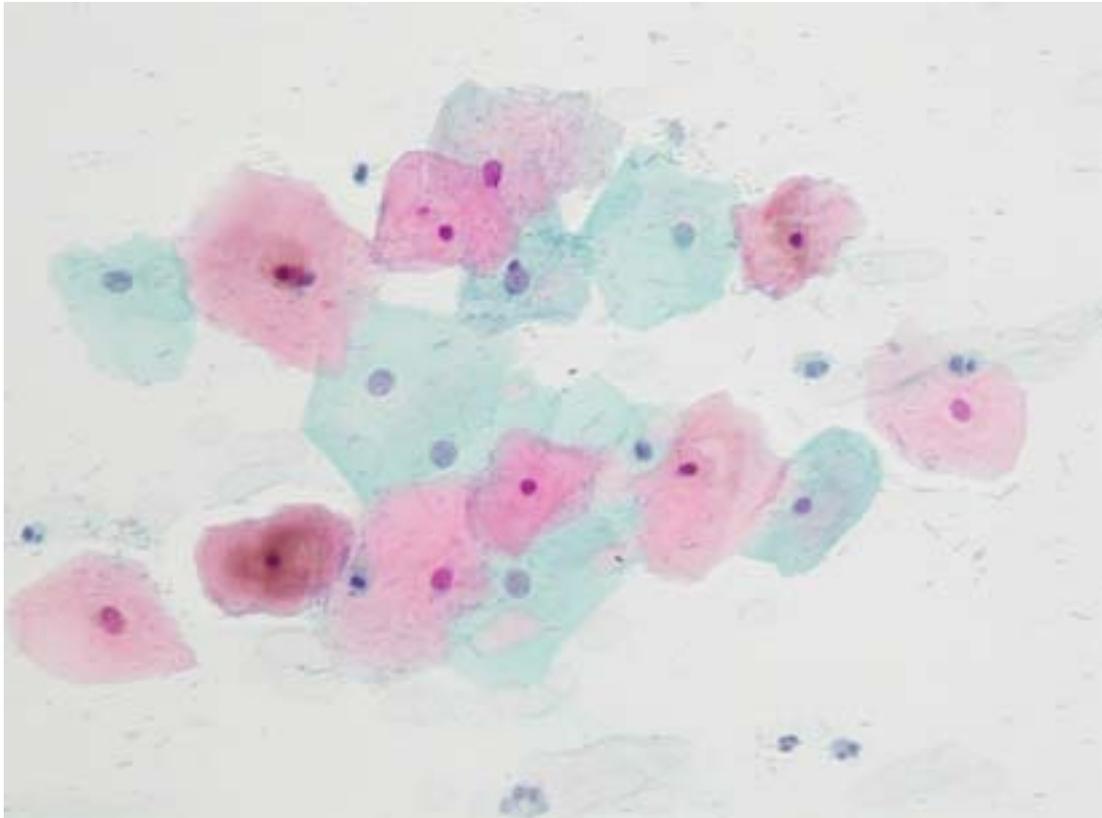


Abb.1 Färbung nach Papanicolaou. Diagnosegruppe II. 200-fache Vergrößerung. Man erkennt unauffällige basophile und eosinophile Superfizialzellen mit normaler Kern-Plasma-Relation. Hintergrund mit Döderleinflora.

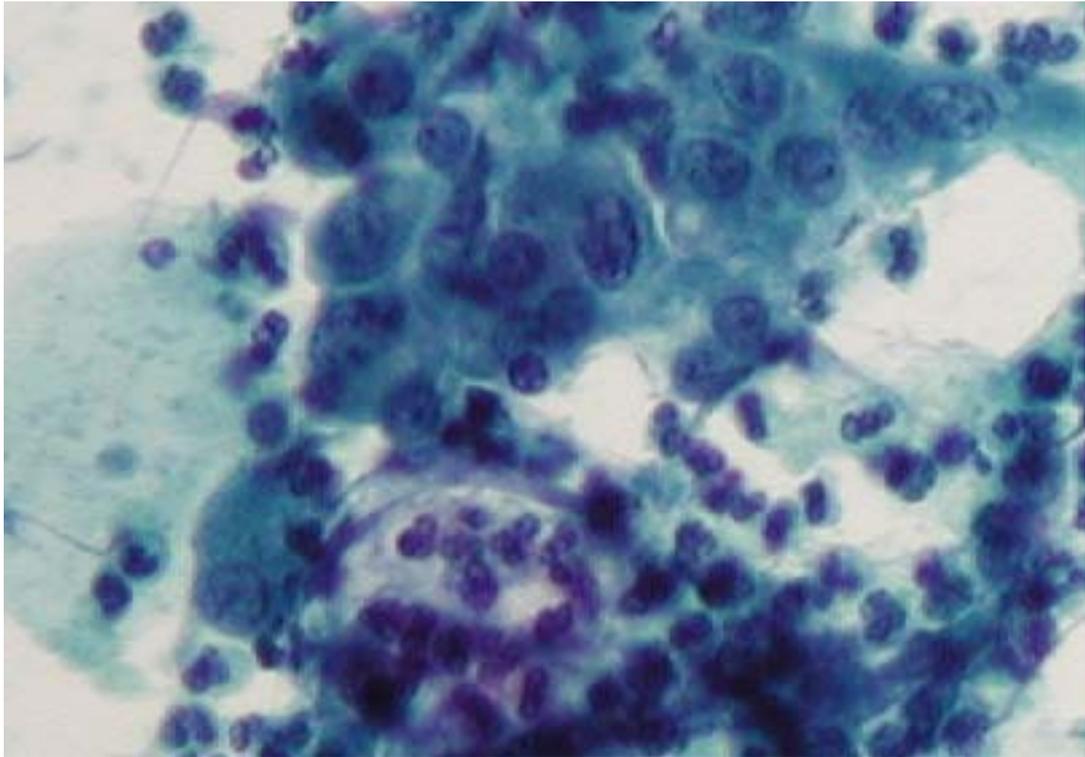


Abb. 2 Färbung nach Papanicolaou. Diagnosegruppe III. 200fache Vergrößerung. Man erkennt Gruppen fraglich atypischer Zellen mit degenerativen Kernvergrößerungen bei erheblicher Endzündung.

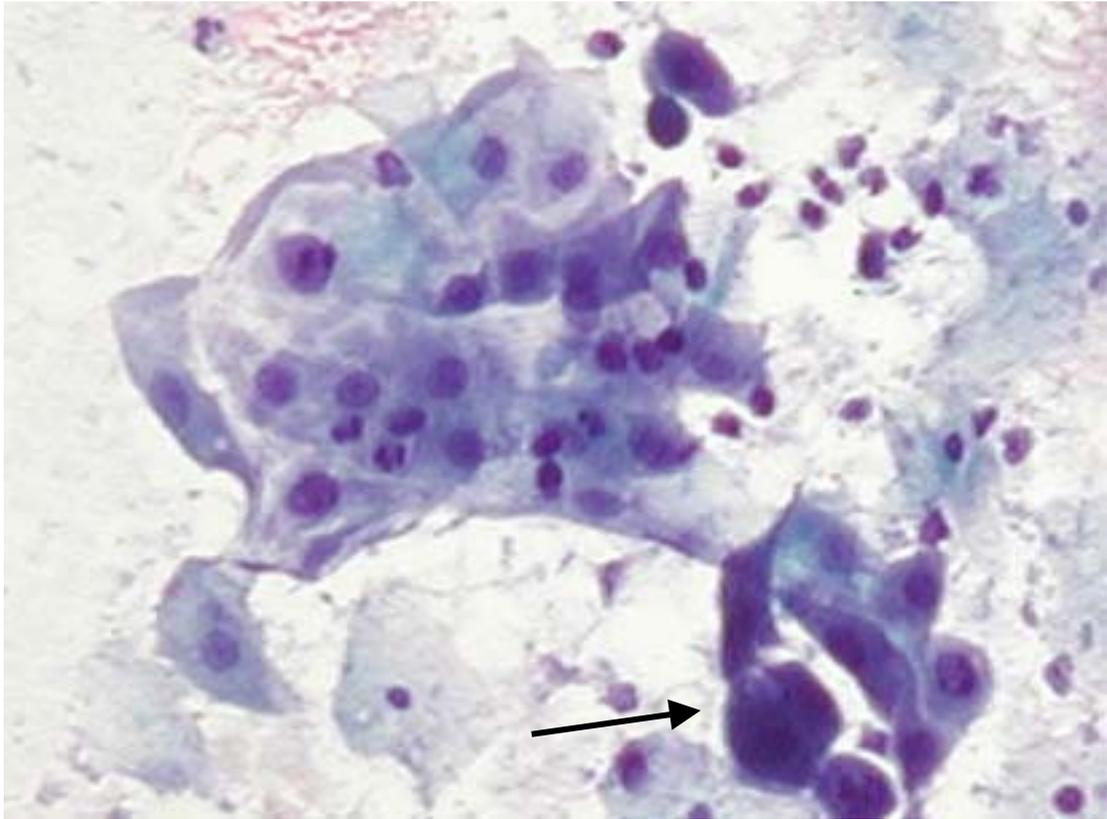


Abb.3 Färbung nach Papanicolaou. Diagnosegruppe III D. 100fache Vergrößerung. Man erkennt (siehe Pfeil) eine Zellgruppe mit Dyskaryosen, sowie diskreter Amphophilie bei zytologischem V.a. eine HPV Infektion.

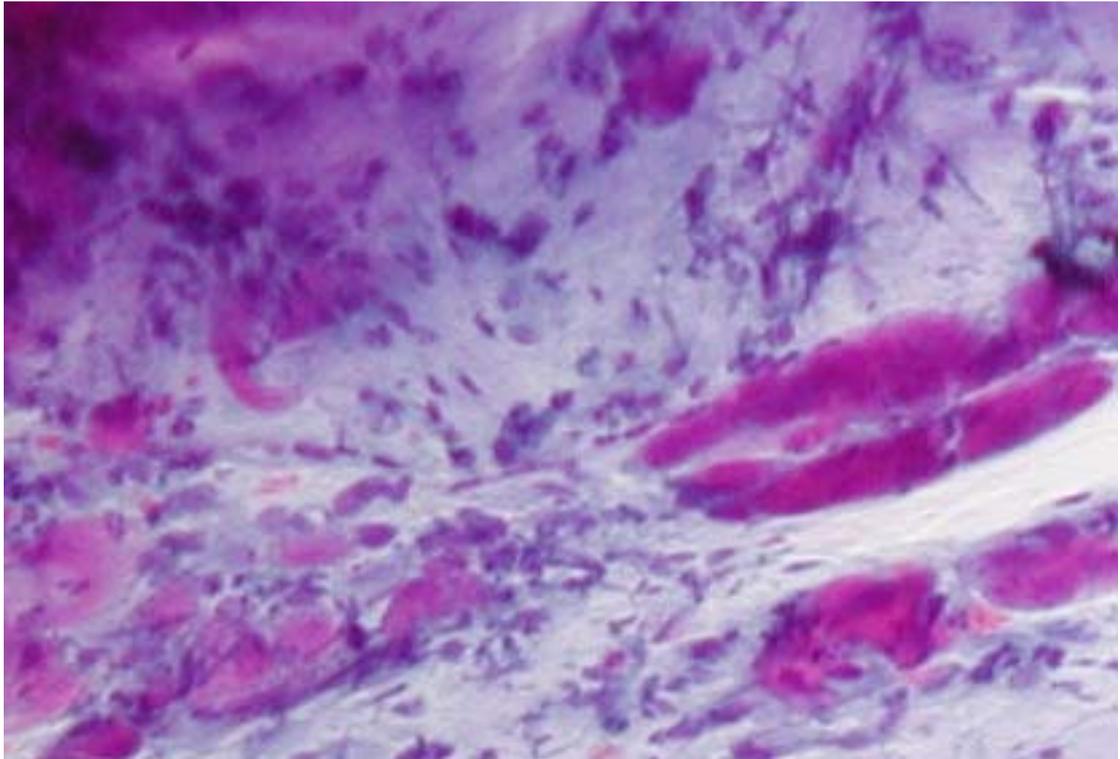


Abb 4. Färbung nach Papanicolaou. Diagnosegruppe IV a, 100fache Vergrößerung. Man erkennt straßenförmig angeordnet sogenannte unreife Dyskaryosen teils eosinophil teils basophil mit stark verschobener Kern-Plasma-Relation. Insgesamt ist das Präparat durch Endzündungszellen überlagert. Zusätzlich abstrichbedingte Artefakte.

Färbung nach Papanicolaou

Tabelle 1: Einzelne Arbeitsschritte im zeitlichen Ablauf.

1. 30 sec. 80%iger Alkohol
 2. 30 sec. 70%iger Alkohol
 3. 30 sec. 50%iger Alkohol
 4. 30 sec. Aqua dest.
 5. 3 bis 6 Minuten Hämatoxylin (Harris)
 6. 30 sec. Aqua dest.
 7. 0,25%ige wässrige Salzsäure (6 mal eintauchen)
 8. 6 Minuten fließendes Wasser
 9. 30 sec. Aqua dest.
 10. 30 sec. 50%iger Alkohol
 11. 30 sec. 70%iger Alkohol
 12. 30 sec. 80%iger Alkohol
 13. 30 sec. 95%iger Alkohol
 14. 90 sec. Orange G 6
 15. 30 sec. 95%iger Alkohol
 16. 30 sec. 95%iger Alkohol
 17. 90 sec. EA 50 (Polychromfarbstoffgemisch nach Papanicolaou)
 18. 30 sec. 95%iger Alkohol
 19. 30 sec. 95%iger Alkohol
 20. 30 sec. 95%iger Alkohol
 21. 30 sec. absoluter Alkohol
 22. 30 sec. Xylol-Alkohol (zu gleichen Anteilen)
 23. 30 sec. Xylol
 24. Eindecken in Caedax, Eukitt oder Kanadabalsam
- } getrennte
Küvette
- } getrennte
Küvette

2.3. Hybrid Capture II Test

Der HPV-Typennachweis erfolgte mit dem Hybrid Capture Test II der Firma Digene Corp. Beltsville, Silver Spring, MD 20705 USA. Im folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte detailliert erläutert.

Kurzbeschreibung des zugrundeliegenden molekularbiologischen Prinzips:

Beim Hybrid Capture II Test handelt es sich um einen Signal amplifizierenden Hybridisierungs Mikrotiterplattenassay Test, mit dem 18 HPV-Typen nachgewiesen werden können. Dabei handelt es sich um 5 Low-risk Typen „Sonde A“ (6, 11, 42, 43, 44) und 13 High-risk Typen „Sonde B“ (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Als Prinzip liegt ein einfacher, nicht radioaktiver Immunotest zu Grunde, welcher RNA-Proben zum Nachweis von viraler Einzelstrang-DNA nutzt. Der Hybrid Capture II Test ist ein semiautomatisiertes Verfahren und hat eine sehr gute interlaborative Reproduzierbarkeit, welche zwischen 87% bis 94% bei den High-risk Typen liegt [15,20,80].

Materialgewinnung –und aufbewahrung:

Die Proben werden mit dem Digene Specimen Collection Kit entnommen und transportiert. Dabei wird die Probe mit einem Watteträger oder einer speziellen Bürste von der Portio entnommen und in das Transportmedium übertragen (Siehe Abb. 5).



Abb. 5

In diesem Transportmedium ist das Material bei Raumtemperatur zu transportieren und kann bis zu 14 Tagen bei Raumtemperatur in diesen Röhren aufbewahrt werden. Für eine längere Lagerung ist eine Temperatur von -20°C erforderlich. Die HPV-Bestimmung muss nicht täglich erfolgen, sondern es werden solange Proben gesammelt, bis mindestens 42 Proben vorliegen (42 Proben pro Mikrotiterplatte). Im Durchschnitt werden in dem Labor 1 bis 2 Messungen in der Woche durchgeführt.

Materialbearbeitung:

Alle Proben und Reagenzien werden zu Testbeginn mittels Wasserbad auf eine Temperatur von $20-25^{\circ}\text{C}$ gebracht.

Zu Beginn der Untersuchung wird das Denaturierungsreagenz hergestellt, indem 5 Tropfen Indikatorfarbstoff zum Reagenz hinzugefügt werden. Dieses färbt sich dadurch dunkel violett. Anschließend werden die Negativ- und die Positiv-Kontrollen und die zu untersuchenden Proben in einem bestimmten Pepettierschema aufgebaut. Zu jeder Probe werden $500\mu\text{l}$ Denaturierungsreagenz

hinzugegeben. Die Negativ-Kontrollen erhalten 1000 μ l. Jede Probe wird dann 5 Sekunden lang bei Höchstgeschwindigkeit in einer speziellen Vorrichtung geschüttelt. Die Mikrotiterplatte mit den Proben wird bei 65°C für 45 Minuten im Wasserbad inkubiert. Dies dient der Zelldenaturierung, damit die DNA in freier Form vorliegt. In dieser Zeit werden die Sondenreagenzien angesetzt. Bei diesem Arbeitsschritt ist besondere Sorgfalt indiziert, da Verunreinigungen durch eine RNAase, die sich auf der Haut, in Haaren, auf Arbeitsflächen und an Gegenständen, die mit bloßen Händen angefasst werden, befinden, zu falschen Ergebnissen führen. Unter Beachtung einer guten Vermischung wird die gelieferte Sonde A und B mit dem Sondenverdünnungspuffer vermischt, und so das Sondenverdünnungsmittel gewonnen. Die Menge des Sondenverdünnungspuffers ist abhängig von der zu erwartenden Probenzahl. Als nächster Schritt wird das Sondenverdünnungsmittel in ein sauberes Röhrchen überführt. Wenn die Proben 45 Minuten im Wasserbad inkubiert wurden, lässt man die Proben abkühlen und es werden dann jeweils 25 μ l Sondenverdünnungsmittel zu den Proben hinzugefügt und gut gemischt. In diesem Sondenverdünnungsmittel befindet sich RNA, die spezifisch die HPV-DNA bindet. Im nächsten Arbeitsgang werden von diesem Gemisch 75 μ l abpipettiert und auf den Boden des entsprechenden Hybridisierungsgefäßes gegeben. Auch bei diesem Schritt ist eine Kontamination zu vermeiden. Die Microtubes, in denen sich die Proben befinden, werden mit Folie abgeklebt und in einem Rotationsschüttler bei 1100 Upm für 3 Minuten geschüttelt. In dieser Zeit bilden sich mögliche RNA-DNA Komplexe. Die Proben werden nun erneut im Wasserbad bei 65°C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend lässt man die Proben abkühlen und pipettiert sie dann vollständig in die Capture Mikrotiterplatte. Diese Captureplatten sind mit spezifischen Antikörpern gegen RNA-DNA Komplexe beschichtet. Wenn alle Proben auf diese Weise überführt wurden, wird die Mikrotiterplatte mit Folie verschlossen und 60 Minuten auf dem Rotationsschüttler bei 1100 Upm geschüttelt. In dieser Zeit stellt man den Waschpuffer aus 100 ml konzentriertem Waschpufferkonzentrat und 2,9 l destilliertem Wasser her. Nach 60 Minuten wird die überstehende Flüssigkeit entfernt. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte werden 75 μ l Nachweisreagenz 1

gegeben, zugeklebt und 30 Minuten bei 20 bis 25°C inkubiert. Der Überstand wird nach diesen 30 Minuten abgekipppt und die Platte für 2 Minuten umgedreht abgelegt, damit die komplette Lösung ablaufen kann. Der anschließende Waschvorgang wird insgesamt 6 Mal durchgeführt, wobei jede Vertiefung der Mikrotiterplatte mit Waschlösung bis zum überlaufen gefüllt wird. Nach dem Waschvorgang wird die Mikrotiterplatte gut getrocknet. Im Anschluss wird in jede Vertiefung 75µl Nachweisreagenz 2 pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit Folie verschlossen und bei 20 bis 25°C 15 Minuten lang inkubiert. In diesem Nachweisreagenz sind alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper, die mit einem Substrat verbunden sind, welches bei seiner Umsetzung Lichtreflexe freisetzt. Man bezeichnet dies als Chemilumineszenz.

Auswertung durch Messung im Luminometer:

Die Messungen erfolgen in einem Luminometer. Nach 15 Minuten Inkubation wird die Mikrotiterplatte im DML 2000 Luminometer abgelesen. Die Ergebnisse werden an den angeschlossenen PC übertragen und in der testspezifischen Software ausgewertet. Zur Qualitätskontrolle läuft bei jedem Testlauf eine negative und eine positive Kontrolle mit. Beide Kontrollen sollen einen Variationskoeffizient $< 25\%$ betragen. Sollte bei einer Kontrolle dieser Wert $> 25\%$ liegen, so wird diese Kontrolle verworfen und der Variationskoeffizient mit den restlichen Kontrollen berechnet. Sollte der Koeffizient erneut $> 25\%$ sein, so gilt der Test als ungültig. Der RLU-Wert für die Negativ-Kontrollen sollte weniger als 250 RLU betragen, ansonsten gilt der Test als ungültig. Zusätzlich wird der Quotient aus dem Durchschnittswert der positiven Kontrollen durch den Durchschnittswert der negativen Kontrollen berechnet. Liegt dieser Quotient unter 2,0 gilt der Test als ungültig. Ist der Test gültig, wird ein Grenzwert berechnet. Entscheidend, ob eine Probe als HPV-positiv oder negativ gilt, ist der Quotient aus dem gemessenen RLU der Probe durch den Grenzwert. Ist dieser Quotient $>$ oder $= 1$, wird der Test als positiv gewertet, ist der Wert < 1 , so wird der als negativ gewertet.

2.4. Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurden die gewonnenen Daten, in Vierfeldertafeln notiert. Die Vierfeldertafeln wurden mittels des Chi-Quadrat Tests mit einem oder zwei Freiheitsgraden ausgewertet. Bei sehr kleinen Fallzahlen in einzelnen Feldern wurde der „Exakte Test“ nach R.A. Fischer angewandt. Die Einzelheiten bei der Durchführung der einzelnen Testverfahren sind in der zitierten Literatur nachzulesen [64].

2.5. Patientengut

Der cervixcytologische Abstrich der Patientinnen wurde im Rahmen der gynäkologischen Krebsvorsorge oder bei einer normalen gynäkologischen Untersuchung gewonnen. Die Abstriche wurden in 162 Fällen mit dem Watteträger durchgeführt, nur in 2 Fällen ist ein Zytobrush benutzt worden. Dies wurde auf dem Anforderungszettel vermerkt.

Die Ausstriche wurden auf einem Objektträger aufgebracht. Die Cytoabstriche wurden nach Abnahme sofort mit Polyäthylenglykolspray fixiert. Die Präparate wurden entweder auf dem Postweg oder mit einem Kurierdienst in das cytologische Labor transportiert. Die Frauenarztpraxen, in denen diese Abstriche entnommen wurden, liegen in folgenden Bundesländern: Niedersachsen, Bremen, Thüringen, Nord-Rhein-Westfalen und Saarland. Die Abstriche wurden von 38 unterschiedlichen Gynäkologen entnommen. Im gesamten Jahr 2000 wurden in dem Labor 81.643 cytologische Präparate befundet. Berücksichtigt man, dass einige Patientinnen mehrmals im Jahr einen Cervixabstrich erhielten, so stammen die 81.643 Präparate von 61.251 Patientinnen.

Die Befunde werden alle in einem speziellen Anwendungsprogramm für Cytologie verwaltet. Dabei handelt es sich um ein Produkt der Firma Datamedia GmbH. Das Zytodataprogramm wurde 1996 installiert. In diesem Programm

werden alle Befunde archiviert und über bestimmte Module können verschiedene statistische Auswertungen erfolgen.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden nur die Patientinnen ausgewertet, die ein cervixcytologisches Abstrichergebnis PAP IIw, PAP IIID, PAP III, PAP IVa, PAP IVb oder PAP V hatten und bei denen zusätzlich eine HPV Diagnostik durchgeführt wurde. Die HPV-Diagnostik wurde mit dem Hybrid Capture II Test durchgeführt.

Diese Bedingungen waren bei insgesamt 164 Patientinnen erfüllt, so dass die Befunde dieser 164 Patientinnen in die Arbeit gingen. Die älteste Patientin des Untersuchungskollektivs war zum Zeitpunkt der Untersuchung 80 Jahre, die jüngste Patientin war 18 Jahre alt.

Die Informationen über die Patientinnen wurden aus den Krebsvorsorgebögen der niedergelassenen Gynäkologen gewonnen. Leider wurden diese häufig nicht ausreichend ausgefüllt, so dass Angaben zur Anzahl von Schwangerschaften, zu kontrazeptiven Methoden, Hormonersatztherapien, Familienstatus und Beruf in vielen Fällen nicht vollständig vorlagen. Angaben zum Alter, zur Krankenversicherung und zum Menopausenstatus waren in allen Fällen vorhanden .

Die Präparate wurden zunächst von Cytologieassistentinnen vorbefundet und abschließend von einem Cytologen überprüft. Die Präparate wurden anschließend durch einen Pathologen nochmals befundet, so dass alle Präparate zweimal befundet wurden. Bei unterschiedlichen Ergebnissen wurden diese Präparate nochmals gemeinsam beurteilt und das Ergebnis festgelegt. Die HPV-Diagnostik wurde auf Anforderung des niedergelassenen Gynäkologen durchgeführt. In einigen Fällen wurde die HPV-Untersuchung wegen eines unklaren cytologischen Befundes durch den Cytologen empfohlen und nach Rücksprache dann auch durchgeführt. Eine alleinige HPV Low-risk Infektion, die bei der Entstehung gutartiger Veränderungen beteiligt sein könnte, z.B. Condylomata accuminata, wurde aufgrund der geringen Assoziation zu malignen Veränderungen in dieser Arbeit keine weitere Bedeutung beigemessen.

3 Ergebnisse

3.1. Zusammensetzung des Patientengutes und Bezug zum Versichertenstatus der Patientin

Die Interpretation und die Diskussion der Ergebnisse muss sehr vorsichtig gestaltet werden, da es sich in dieser Arbeit um eine sehr geringe Fallzahl handelt.

Die in dieser Arbeit retrospektiv beobachteten Patientinnen befanden sich zwischen dem 18. und dem 80. Lebensjahr. 50% der untersuchten Patientinnen waren jünger als 35 Jahre. 23 der untersuchten Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in der Postmenopause, 141 Pat. befanden sich in der Prämenopause.

Der Anteil der gesetzlich versicherten Patientinnen beträgt 151, zu 13 Patientinnen, die in einer privaten Krankenkasse versichert sind. Das Verhältnis gesetzlich Krankenversicherter Patientinnen zu Privatpatientinnen von ca. 1:10 entspricht in etwa der bundesweiten Verteilung des Versichertenstatus.

Siehe Tab. 2

Tab. 2

Versicherung	Gesamt zahl	High Risk	Low Risk	Beide	Neg.
Privat	13	2 1 x PAP III D 1 x PAP IV a	0	1 1 x PAP III D	10 8 x PAP IIID 2 x PAP II w
BKK	16	9 1 x PAP II w 5 x PAP III D 2 x PAP IV a 1 x PAP V	0	2 1 x PAP III D 1 x PAP IV a	5 3 x PAP II w 2 x PAP IIID
AOK	47	25 3 x PAP II w 1 x PAP III 19xPAP IIID 2 x PAP IV a	2 1x PAP III 1x PAP IIID	6 1 x PAP II w 4 x PAP III D 1 x PAP IV a	14 4x PAP II w 9xPAPIIID 1 x PAP IV a
BEK	27	15 4 x PAP II w 8 x PAP III D 3 x PAP IV a	0	3 3 x PAP III D	9 1 x PAP II w 1 x PAP III 6 x PAP III D 1 x PAP IV a
Pflichtver- sicherte total	151	87 19 x PAP II w 1 x PAP III 51 x PAP III D 13 x PAP IV a 3 x PAP V	5 1x PAP IIw 1x PAP III 3x PAP IIID	18 1 x PAP II w 15x PAP IIID 2 x PAP IV a	41 11 x PAP II w 2 x PAP III 26 x PAP III D 2 x PAP IV a

Aus insgesamt 81.643 Präparaten kamen 164 zur Auswertung. Siehe Tab. 3

Tab. 3:

	Präparate	Patientinnen	Mit HPV Diagnostik s.u.
PAP II w	819	512	34
PAP IIID	653	496	105
PAP III	72	66	4
PAP IV a	84	67	18
PAP IV b	2	2	0
PAP V	21	20	3
Gesamt	81.643	61.251	164 (Untersuchungskollektiv)

3.2. HPV Befund im Vergleich zum cytologischen Befund

Wird der cytologische Befund in Abhängigkeit einer HPV High-risk Infektion statistisch ausgewertet (Exakter Test), so ist bei cytologischen Befunden, PAP IV a und PAP V signifikant häufiger eine HPV High-risk Infektion nachweisbar als bei PAP IIw, PAP III und PAP IIID. Nur in 2 Fällen konnte keine HPV Infektion nachgewiesen werden. Vergleicht man die unklaren Befunde PAP IIw, PAPIII mit PAP IIID (leichte bis mittlere Dysplasie entsprechend), so gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit einer HPV High-risk Infektion. Siehe Tab. 4a und b und Diagramm 1a und b.

PAP versus HPV Status

Tab. 4 a

	HPV High-risk pos.	HPV High-risk neg.	Summe
PAP IIw	20	14	34
PAP III	1	3	4
PAP III D	68	37	105
PAP IV a	16	2	18
PAP V	3	0	3
Summe	105	49	154

Tab. 4 b

	HPV High-risk pos.	HPV High-risk neg.	Testergebnis
PAP IIw vs PAP IVa+PAP V	20 19	14 2	Exakter Test p=0,011-> signifikant
PAP III vs PAP IVa+PAP V	1 19	3 2	Exakter Test p=0,016-> signifikant
PAP IIID vs PAP IVa+PAP V	68 19	37 2	Exakter Test p=0,034 -> signifikant
PAP IIw vs PAP IIID	20 68	14 37	Chi Quadrat Test $\chi^2 < 0,5$ -> nicht signifikant
PAP III vs PAP IIID	1 68	3 37	Exakter Test p= 0,139-> nicht signifikant

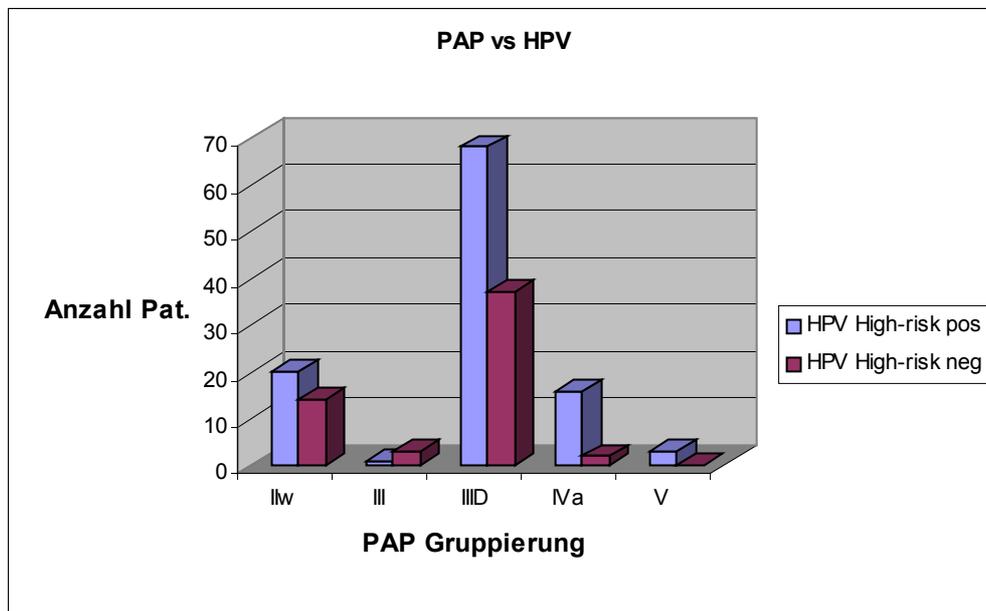
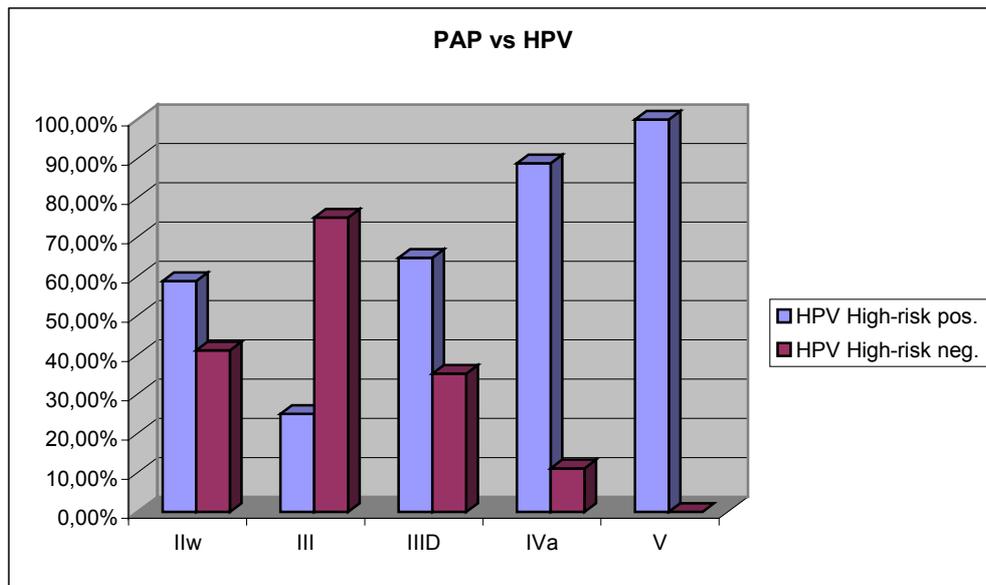
Diagramm 1 a:**Diagramm 1b:**

Diagramm 1a und b: In der Gruppe der schweren Dysplasien (PAP IV a) und der vermuteten invasiven Carcinome (PAP V) kommt die HPV High-risk Infektion signifikant häufiger vor als in der Gruppe der PAP IIw, PAP III und PAP IIID.(Exakter Test für alle Vergleiche signifikant).

3.3. HPV High-risk Infektion bei unterschiedlichen Versichertenstatus

Betrachtet man die Häufigkeit einer HPV High-risk Infektion bei gesetzlich krankenversicherten Patientinnen, so kommt eine solche Infektion in diesem Patientinnenkollektiv signifikant häufiger vor als bei Patientinnen die in einer privaten Krankenkasse versichert sind. 69,5 % der gesetzlich Versicherten versus 23,1% der „privat Versicherten“. Der Chi-Quadrat Test ergibt ein $p < 0,005$. Damit ist der Unterschied hoch signifikant. Werden die unterschiedlichen gesetzlichen Krankenkassen (AOK, BEK, BKK) miteinander verglichen, so kommt eine HPV High-risk Infektion in einer Häufigkeit von 66,0 % (AOK) bis 68,8% (BKK) vor. Der Unterschied ist nicht signifikant. Siehe Tab. 5 a und b und Diagramm 2a bis d

Versichertenstatus versus HPV-Status

Tab. 5a

	HPV High-risk pos.	HPV High-risk neg.	Summe
Privat	3	10	13
Pflichtversichert	105	46	151
Summe	108	56	164
Absolute Zahlen Chi Quadrat Test mit einem Freiheitsgrad, liefert ein $\chi^2 > 11 \rightarrow p < 0,005$, damit hoch signifikant			

Gesetzliche Krankenkassen untereinander im Vergleich

Tab. 5b

	HPV High-risk pos.	HPV High-risk neg.	Summe
BKK	11	5	16
AOK	32	19	51
BEK	18	11	29
Summe	61	35	96

Chi Quadrat Test: Nicht signifikant

Diagramm 2 a:

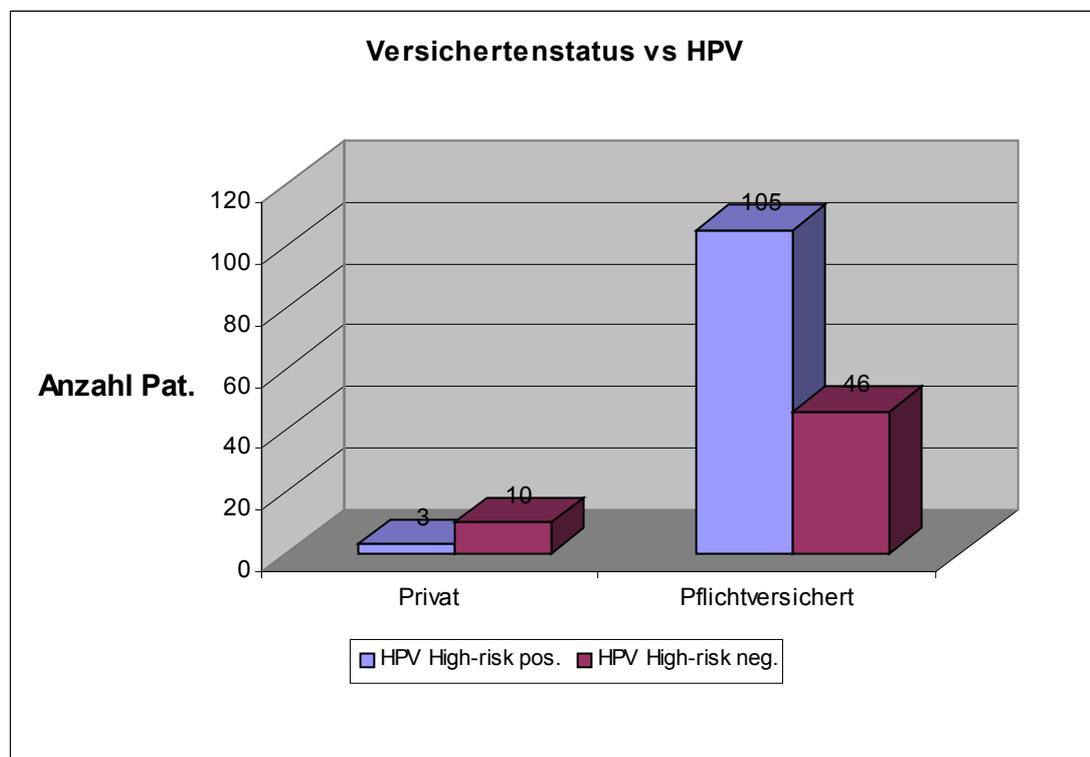


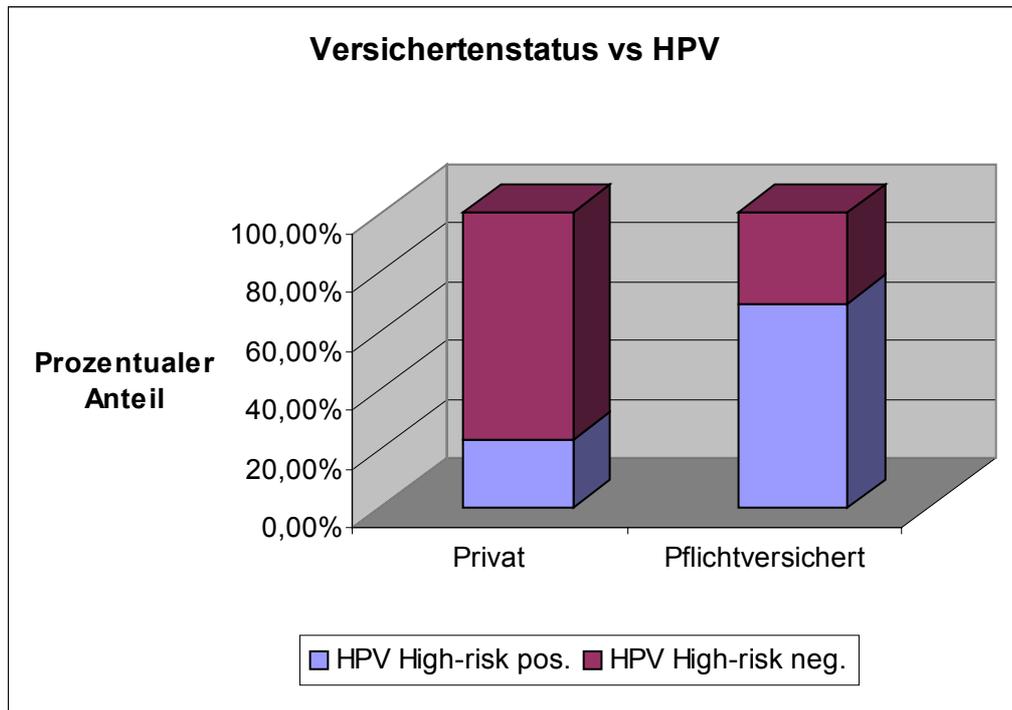
Diagramm 2 b:

Diagramm 2 a + b: Von 164 untersuchten Patientinnen sind 151 pflichtversichert, von diesen sind 105 HPV High-risk positiv und 46 High-risk negativ. Bei den privatversicherten Pat. sind von 13 Pat. 3 HPV High-risk positiv und 10 HPV High-risk negativ. Der Chi-Quadrat Test liefert ein $p < 0,005$ (hoch signifikant), damit ist die HPV High-risk Infektion in der pflichtversicherten Gruppe signifikant häufiger als in der privatversicherten Gruppe.

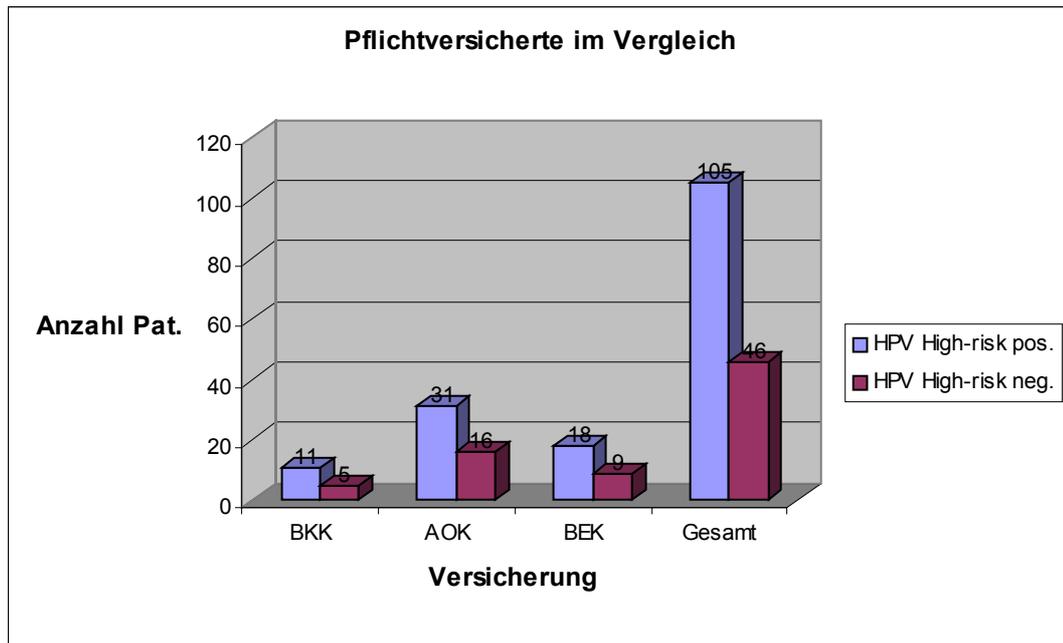
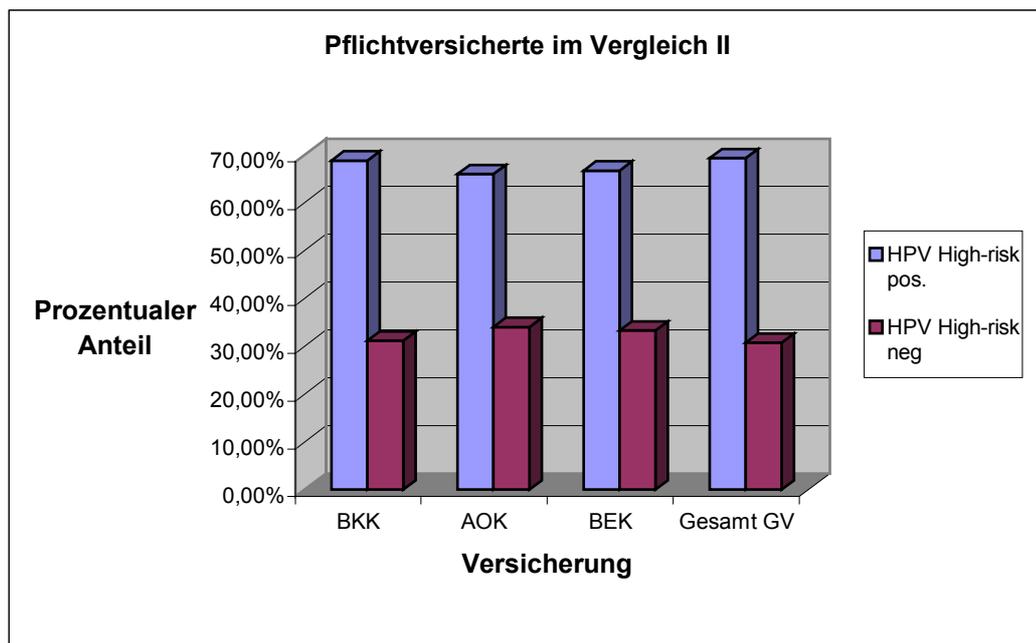
Diagramm 2 c**Diagramm 2 d**

Diagramm 2 c und d: Der Vergleich unter den pflichtversicherten Pat. erbringt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Krankenkassen. Somit lässt sich nur ein Unterschied aus dem Gesamtkollektiv aller Pflichtversicherten versus der Privatversicherten darstellen. Den größten Anteil an den pflichtversicherten Pat. stellt die AOK.

3.4. PAP-Befund bei unterschiedlichem Versichertenstatus

Wird bei dem hier ausgewähltem Kollektiv der cervixcytologische Befund in Abhängigkeit von dem Versichertenstatus geprüft, so sind die unterschiedlichen zytologischen Befundkategorien unabhängig vom Versichertenstatus verteilt. D.h. anders als bei dem HPV High-risk Status ist hier kein signifikanter Unterschied nachzuweisen. Siehe dazu Tabelle 6a,b und Diagramm 3 a und b.

Versichertenstatus versus PAP

Tab. 6a

	PAP IIw	PAP III	PAP IIID	PAP IVa	PAP V	Summe
Privat	2	0	10	1	0	13
Pflichtversichert	32	4	95	17	3	151
Summe	34	4	105	18	3	164
Exakter Test: nicht signifikant!						

Tab. 6b

	Privat	Pflichtversichert	Testergebnis
PAP IIw vs PAP IVa+V	2 1	32 20	Exakter Test $p > 0,5$ -> nicht signifikant
PAP III vs PAP IVa+V	0 1	4 20	Exakter Test $p > 0,5$ nicht signifikant
PAP IIID vs PAP IVa+V	10 1	95 20	Exakter Test $p > 0,38$ -> nicht signifikant
PAP IIw vs PAP IIID	2 10	32 95	Exakter Test $p > 0,5$ nicht signifikant
PAP III vs PAP IIID	0 10	4 95	Exakter Test $p > 0,5$ nicht signifikant

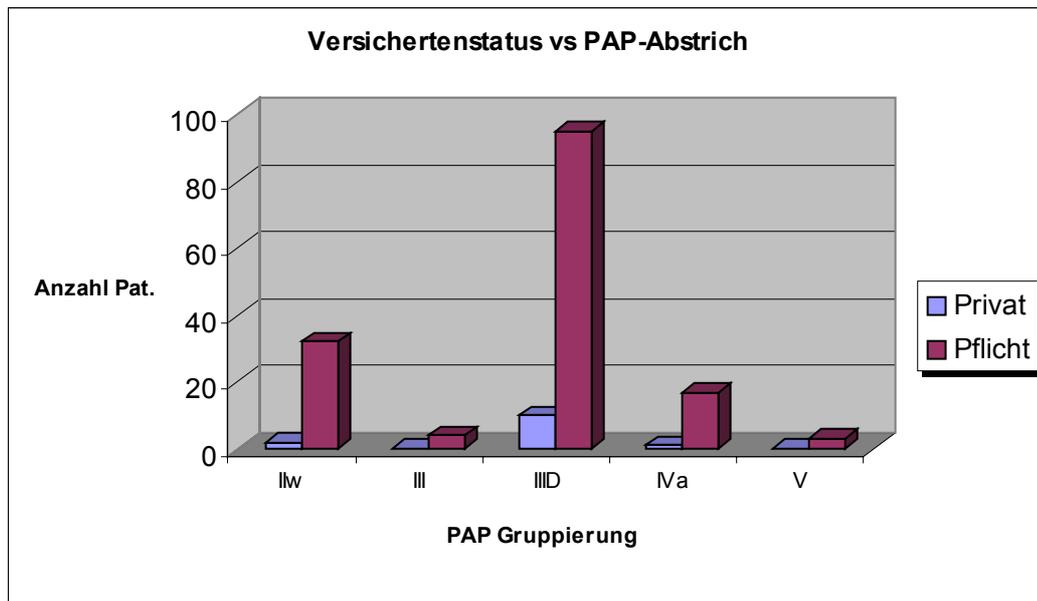
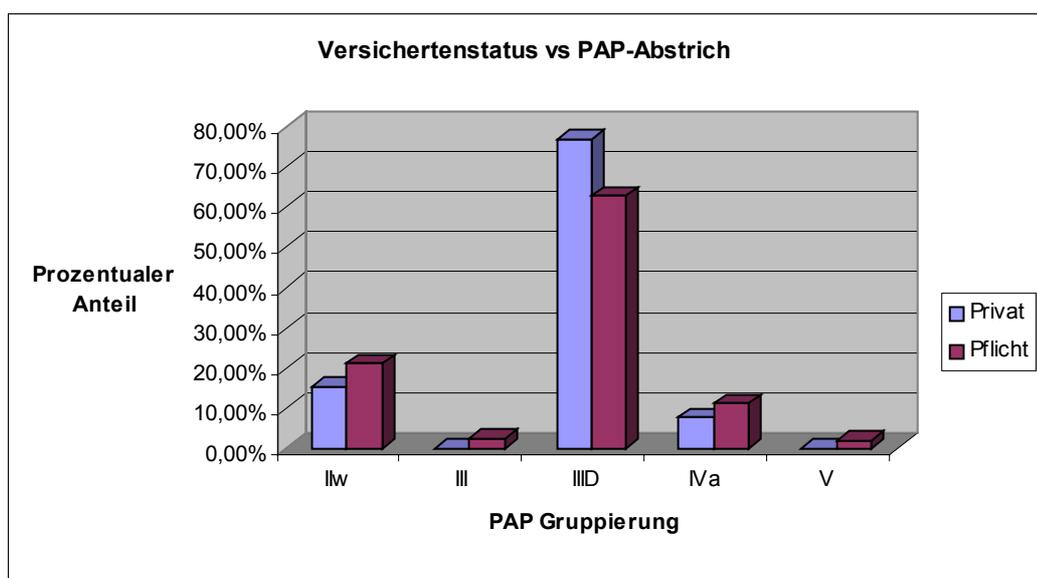
Diagramm 3 a:**Diagramm 3 b:**

Diagramm 3 a und b: Der Vergleich des cervixcytologischen Abstrichergebnisses unter den beiden Versicherungsgruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied. Wie im Diagramm 3 a und b dargestellt wird, ist das Ergebnis unabhängig von der Zusammenfassung der einzelnen PAP Gruppen.

3.5. Histologie versus HPV Status

In 35 Fällen wurde eine histologische Abklärung durchgeführt. Diese wurde in 33 Fällen durch Konisation und in 2 Fällen durch Cervix PE gewonnen. Die pathologischen Befunde lagen in Kopie vor. Das entspricht ca. 20% aller beobachteten Patientinnen. In vier Fällen wurde eine unauffällige Histologie gewonnen. Von diesen Fällen, hatten drei Patientinnen einen positiven HPV High-risk Status, eine Patientin hatte einen negativen HPV Status. Bei den restlichen Untersuchungen gab es drei Patientinnen mit einem negativem HPV Status, die dazugehörige Histologie ergab zweimal ein CIN I und einmal ein CIN II.

Bei allen höhergradigen Dysplasien lag eine HPV High-risk Infektion vor. Für die statistische Auswertung wurde der Exakte Test angewendet. Dieser Test ergab ein $p = 0,037$. Der Unterschied ist damit statistisch signifikant. Siehe dazu Tab. 7 a und b und Diagramm 4 a und b.

Histologie versus HPV Status

Tab. 7 a

	HPV High-risk pos.	HPV High-risk neg.	Summe
CIN I	2	2	4
CIN II+III	24	1	25
invasives Ca	2	0	2
Summe	28	3	31

Tab.7 b

	Anzahl	HPV	PAP	Versicherung
CIN 1	4	2 x High-risk 2 x negativ	Alle PAP III D	1 x Privat (HPV neg.) 2 x AOK (2 x HPV High-risk) 1x Sonstige
CIN 2	7	3 x High-risk 3 x beide 1x negativ	2 x PAP III D 5 x PAP IV a	Alle gesetzlich
CIN 3	18	17 x HPV High-risk 1 x beide	1 x PAP II w 6 x PAP III D 9 x PAP IV a 2 x PAP V	1 x Privat 17 x gesetzlich
Invas. Ca	2	2 x High-risk	1 x PAP IV a 1 x PAP V	Beide gesetzlich
Unauffällig	4	3 x High-risk 1 x beide	3 x PAP III D 1 x PAP IV a	Alle gesetzlich

Diagramm 4 a:

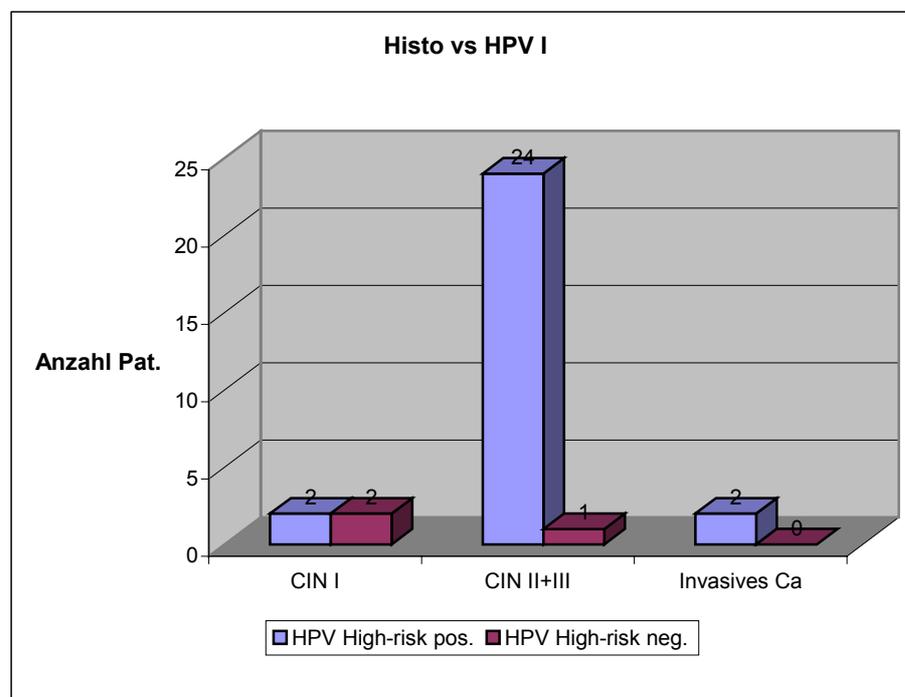


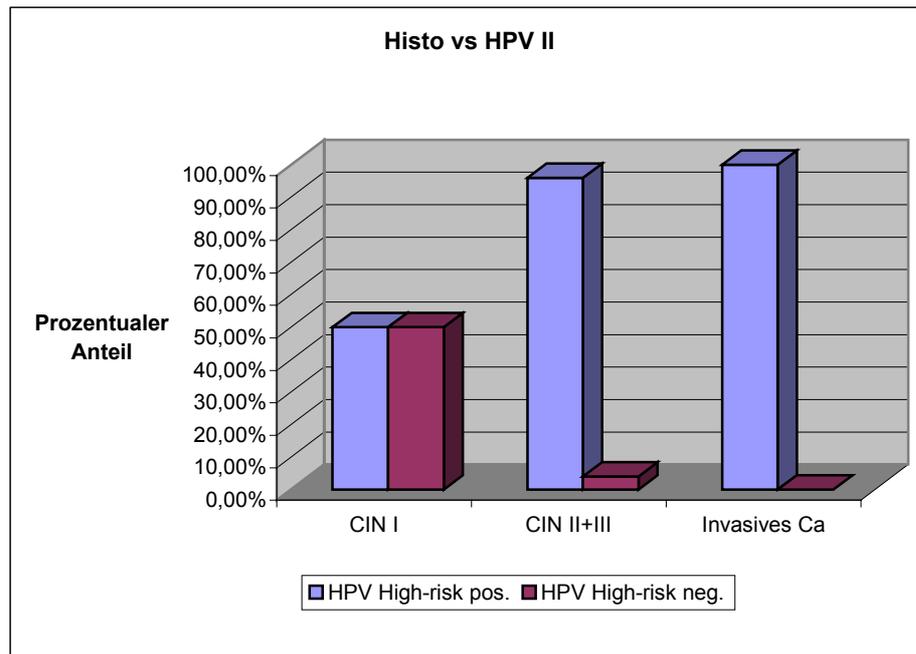
Diagramm 4 b:

Diagramm 4 a und b: In Diagramm 4a sind die Werte in absoluten Zahlen dargestellt, in Diagramm 4b werden prozentuale Werte dargestellt. Vergleicht man die einfachen histologischen Dysplasiestufen mit den schweren Dysplasiestufen und den invasiven Carcinomen, so ergibt der Exakte Test ein $p= 0.037 < 0,05$ und ist somit signifikant. Dies bedeutet, dass bei den schweren Dysplasien signifikant häufiger eine HPV High-risk Infektion vorliegt als in der Gruppe mit den leichten bis mäßigen Dysplasien. In diesem Kollektiv betrug die Infektionsrate mit HPV High-risk 72,7 %, in der Gruppe der schweren Dysplasien und der invasiven Carcinome 100 %.

3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten deuten daraufhin, dass eine HPV High-risk Infektion mit einer cytologisch-dysplastischen Veränderung im Bereich der Cervix uteri korreliert. Dies stimmt mit den Literaturdaten überein[69]. Von 35 durchgeführten histologischen Untersuchungen wurde in 18 Fällen (51,4%) die Assoziation HPV High-risk Infektion mit CIN III bestätigt. In allen CIN III Fällen, wurde eine HPV High-risk Infektion nachgewiesen. Trotz der sehr geringen Fallzahl, stimmt die hier gewonnene Sensitivität des HPV High-risk Nachweises bei CIN III Befunden annähernd mit den Literaturdaten überein [63]. Unter diesen 18 Fällen der histologisch nachgewiesenen CIN III wurde in 6 Fällen ein Befund der Gruppe PAP IIID erhoben.

In 4 von 35 Fällen wurde keine histologisch dysplastische Veränderung nachgewiesen, wobei die Cytologie in einem Fall von einer schweren Dysplasie (PAP IV a)ausgegangen war und in 3 Fällen eine mäßige Dysplasie (PAP IIID) erwartet wurde. In all diesen Fällen lag ein positiver HPV High-risk Status vor.

Einen Unterschied gab es bei dem HPV High-risk Status bei Patientinnen unterschiedlicher Versicherungszugehörigkeit. In diesem Patientinnenkollektiv lag die HPV High-risk Rate bei den gesetzlich versicherten Patientinnen ca. 3 mal so hoch als bei den privat Versicherten. Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant, wobei berücksichtigt werden muss, dass es sich um ein geringes Patientinnengut handelt. Ein solcher Trend läßt sich bei den cytologischen Abstrichergebnissen nicht nachweisen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Versicherungszugehörigkeit.

Bei der statistischen Auswertung der cervixcytologischen Befunde in Korrelation zum HPV High-risk Status konnte eine HPV High-risk Infektion signifikant häufiger bei Läsionen PAP IVa und PAP V nachgewiesen werden.

4 Literaturübersicht mit Diskussion

4.1. Inzidenz des Cervixcarcinoms und seiner Vorstufen.

Das Cervixcarcinom ist hinter dem Colocarzinom und dem Mammacarcinom das dritthäufigste Carcinom der Frau weltweit. 350.000 Frauen sterben an dieser Erkrankung weltweit pro Jahr [49]. Da in Deutschland ein zentrales Krebsregister fehlt, wird die Zahl der Neuerkrankungen vom statistischem Bundesamt auf ca. 7.000 pro Jahr geschätzt [77]. Damit ist das Cervixcarcinom hinter dem Endometrium- und dem Ovarialcarcinom, das dritthäufigste Genitalcarcinom der Frau in Deutschland.

Das Erkrankungsalter liegt bei einem Maximum zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr. In den letzten Jahren ist in den Industrienationen eine Abnahme der Inzidenz des invasiven Carcinoms zu verzeichnen, gleichzeitig kam es zu einer Zunahme der schweren Dysplasien und der Carcinoma in situ. Diese Veränderungen sind als Resultat des Krebsvorsorgeprogramms anzusehen [53].

In den meisten Fällen machen die Präkanzerosen keine klinischen Beschwerden oder Symptome. Hinweise können veränderter vaginaler Fluor, Kontaktblutung oder eine Kolpitis sein.

Die Präkanzerosen der Cervix uteri entstehen an der Grenze zwischen dem originärem, nicht verhornendem Plattenepithel der Ektozervix und dem einschichtigem Zylinderepithel der Endozervix, der sogenannten Transformationszone oder Übergangszone. Dieser Bereich der Transformationszone erscheint gegenüber kanzerogenen Einflüssen weniger widerstandsfähig.

Die Grenze zwischen Plattenepithel und Zylinderepithel verändert sich physiologischerweise entsprechend dem Gestaltwandel der Cervix zu verschiedenen Lebensaltern der Frau. Beim jungen Mädchen wird die Portio durch das Plattenepithel bedeckt, die Transformationszone liegt endocervikal. Bei geschlechtsreifen Frauen liegt dieser Bereich relativ weit auf der Ektocervix, bei

älteren Frauen relativ weit auf der Endocervix. Das ektocervikal liegende Zylinderepithel wird im Verlauf von mehreren Jahren durch den Progreß der indirekten Metaplasie oder direkten Überhäutung mittels sekundär originärem Plattenepithel ersetzt.

Die Präkanzerosen werden in leichte, mäßige und schwere Dysplasien bzw. in das Carcinoma in situ eingeteilt. In den 70er Jahren wurde der Begriff der Cervikalen Intraepithelialen Neoplasie eingeführt (CIN I-III Bethesda Nomenklatur). Siehe Abb. 5

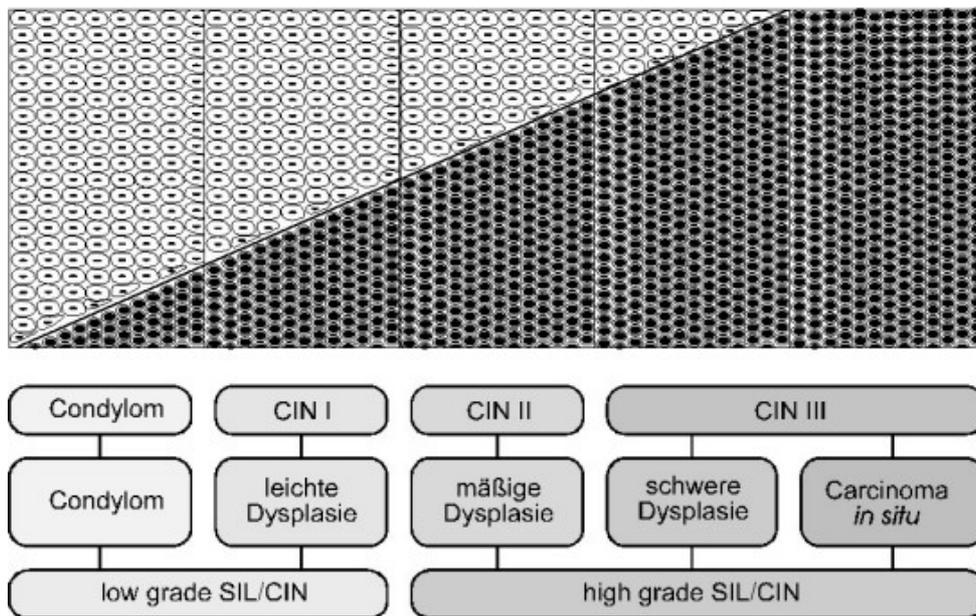


Abb. 5: Verschiedene Nomenklaturen für zervikale Präkanzerosen. [69]

Mitte der 40iger Jahre wurde durch Papanicolaou und Traut die cytologische Untersuchung der Cervix uteri eingeführt. Hierbei wird mit unterschiedlichen Entnahmeanstrumenten, wie Watteträgern, Bürste oder Spatel zelluläres Material von der Cervix uteri entnommen. Dabei werden ekto- und endocervikale Zellen auf einem Objektträger ausgestrichen und sofort fixiert. Lichtmikroskopisch können neben unauffälligen Plattenepithelzellen und Endocervicalzellen, Metaplasien und Dysplasien und gegebenenfalls Tumorzellen differenziert werden. Die Einteilung der lichtmikroskopischen Befunde orientiert sich an der

Münchener Klassifikation II der Cytologie aus dem Jahre 1997, welche im folgenden erläutert wird:

Münchener Klassifikation II der Zytologie

PAP I.

Normales Zellbild, dem Alter entsprechend, einschließlich leichter entzündlicher und degenerativer Veränderungen sowie bakterieller Cytolyse.

Empfehlung: Kontrolle in 1 Jahr

PAP II

Deutlich entzündliche Veränderungen an Zellen des Platten- und cervikalen Zylinderepithels. Zellen aus Regenerationsepithel, unreife metaplastische Zellen, stärkere degenerative Zellveränderungen, Para- und Hyperkeratosezellen. Normale Endometriumzellen, auch nach der Menopause. Ferner spezielle Zellbilder wie folliculäre Cervizitis, Zellveränderungen bei IUP, Zeichen einer HPV-Infektion ohne wesentliche Kernveränderungen. Zeichen einer Herpes- oder Zytomegalievirusinfektion.

Empfehlung: gegebenenfalls cytologische Kontrolle, Zeitabstand je nach klinischem Befund – evtl. nach vorheriger Entzündungsbehandlung oder Aufhellung durch Hormongaben

PAP III.

Unklarer Befund

- Schwere entzündliche, degenerative oder iatrogene Zellveränderungen, die eine sichere Beurteilung zwischen gut- und bösartig nicht zulassen

- Auffällige Zellen eines Drüsenepithels, deren Herkunft aus einem Carcinom nicht sicher auszuschließen ist, möglichst mit Hinweis, ob die Zellen endometrialen, endocervikalen oder extrauterinen Ursprungs sind.

Empfehlung: je nach Klinischem Befund kurzfristige cytologische Kontrolle nach Entzündungsbehandlung oder hormoneller Aufhellung oder sofortige histologische Abklärung.

PAP III D

Zellen einer Dysplasie leichten bis mäßigen Grades (Zeichen einer HPV-Infektion sollten besonders erwähnt werden)

Empfehlung: Kontrolle in 3 Monaten

PAP IVa.

Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ (Zeichen einer HPV-Infektion sollten besonders erwähnt werden)

Empfehlung: histologische Klärung, ausnahmsweise cytologische Kontrollen, z.B. in der Schwangerschaft, plus erweiterte Kolposkopie.

PAP IVb.

Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ, Zellen eines invasiven Carcinoms nicht auszuschließen

Empfehlung: histologische Klärung

PAP V.

Zellen eines malignen Tumors

- Zellen eines Plattenepithelcarcinoms (verhornend oder nicht verhornend)

- Zellen eines Adenocarcinoms, möglichst mit Hinweis, ob endometrialen, endocervikalen oder extrauterinen Ursprungs
- Zellen sonstiger maligner Geschwülste

Empfehlung: histologische Klärung

PAP IIW

Zellen, die aufgrund ihrer speziellen Morphologie schwer interpretierbar oder durch technische, degenerative oder entzündliche Einflüsse so verändert sind, dass sie von reifen oder mittelreifen Dyskaryosen nicht zu unterscheiden sind.

Empfehlung: Abstrichkontrolle in 3-6 Monaten, ggf. nach Kolpitis oder Östrogenbehandlung.

Diese Befundgruppe gehört nicht zu der Münchener Klassifikation II, sondern ist eine modifizierte und viel verwandte Befundgruppe.

In Deutschland und den meisten anderen Staaten in Europa, wird vorwiegend die histologische Unterteilung in leichte, mäßige, schwere Dysplasie und *Carcinoma in situ* verwandt. In den 70er Jahren wurde der Begriff der cervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) eingeführt, wobei zwischen CIN I, II und III unterschieden wurde [60] Diesem System lag die Hypothese zugrunde, daß sich alle leichten Dysplasien (CIN I) nach einem bestimmten Zeitraum in schwergradige Präkanzerosen (CIN III) entwickeln. Als weiteres Klassifikationssystem wurde 1988 auf der Bethesda-Konferenz der Begriff squamöse intraepitheliale Laesion (SIL) eingeführt, wobei hier nur zwischen zwei verschiedenen Schweregraden, low grade und high grade SIL, unterschieden wird.

4.2. Die verschiedenen HPV-Nachweisverfahren und ihre Praktikabilität.

Eine HPV-Infektion kann durch den Nachweis von HPV Nukleinsäure im Gewebe oder Abstrich, durch den Nachweis von virusspezifischen Antikörpern im Serum oder von Proteinen in Geweben erfolgen. Die einzelnen Untersuchungsverfahren unterscheiden sich erheblich im Aufwand, der Durchführung, der Sensitivität, der Spezifität, im Preis und der Reproduzierbarkeit. Die Isolation des Virus in Gewebekulturen ist für humane Papillomviren nicht möglich, da HP-Viren nur in ihrem natürlichen Wirt, dem Menschen, propagiert werden können. Zum Nachweis einer HPV Infektion, ist zur Zeit, der direkte Nachweis von HPV DNA oder RNA aus Gewebeproben oder Zellabstrichen die Methode der Wahl. Man unterscheidet bei den Nachweisverfahren zwischen amplifizierenden und nicht-amplifizierenden Nachweisverfahren. Auf die einzelnen Verfahren wird nun im einzelnen eingegangen.

Der Hybrid Capture Assay (Fa. DigeneAbbot/ Hybrid Capture® II) ist eine Weiterentwicklung der ersten klassischen Hybridisierungsverfahren, dem Hybrid Capture Tube Test. Bei dem Hybrid Capture® II gibt es Sondengemische für Low-risk- und High-risk HPV Typen und macht somit eine Differenzierung zwischen diesen beiden Risikoprofilen möglich. Der Hybrid Capture® II verwendet im Vergleich zu seinem Vorgänger keine Röhrchen mehr, sondern verwendet Mikrotiterplatten. Er kann mit der B-Sonde vier High-risk Typen mehr nachweisen als der Vorgänger. Mit diesem Test können 18 genitale HPV-Typen detektiert werden, 5 Low-risk und 13 High-risk Typen. Eine genaue HPV-Typenbestimmung gelingt mit diesem Test nicht. Der genaue Testablauf ist im Kapitel Patientengut und Methode aufgeführt, siehe Kapitel 2.3.

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden definierte virale DNA Abschnitte, welche von zwei komplementären Oligonukleotiden (Primern)

begrenzt werden, spezifisch bis zu 100.000. fach vervielfältigt. Die amplifizierende Virus-DNA Fragmente können in der Gelelektrophorese leicht im Agarosegel sichtbar gemacht werden. Die Empfindlichkeit hängt von sogenannten Primern und den PCR Bedingungen ab. Degenerierte Primer ermöglichen die Amplifikation eines weiten Spektrums von HPV-Typen. Sie sind gruppenspezifisch und weniger typenspezifisch und erkennen auch neue Virustypen. Es werden hauptsächlich folgende Systeme eingesetzt.

- MY09-MY11 Primer, zuerst von Manos et al. 1989 beschrieben.
- Der General Primer GP5/GP6, zuerst von Snijders et al. 1990 beschrieben.
- Nicht-degenerierte Primer bestehen aus einer definierten Nukleotid Sequenz, die HPV typenspezifisch ist und damit dem Nachweis bestimmter HPV-Typen dient.

Die Sensitivität der PCR ist sehr hoch, man kann theoretisch eine einzige Virus-DNA Kopie nachweisen.

In besonderen Fragestellungen kann man die PCR mit anderen Techniken koppeln, wie z.B.:

- Transfer der Banden auf Nylonmembranen und Hybridisierung zur Erhöhung der Sensitivität und der Spezivität.
- Koppelung mit ELISA zum quantitativen Nachweis der HPV-DNA.

Zur exakten Typisierung wird das PCR-Produkt durch Restriktionsenzyme gespalten und zur Auftrennung in Polyacrylamidgel mit nachfolgender Detektion der Spaltprodukte gegeben.

Die PCR weist eine extrem hohe Empfindlichkeit auf, dies ist aber auch für die Schwäche der Methode verantwortlich. Die PCR ist sehr störanfällig gegen Kontamination, was einen sehr hohen und qualifizierten Arbeitsaufwand bedeutet und damit sehr teuer ist und zum anderen erfasst sie auch geringfügige und latente HPV-Infektionen, die klinisch meist ohne Relevanz sind. Die PCR ist aufgrund der hohen Ansprüche an das Handling, der hohen Kosten und der vielen

Fehlermöglichkeiten nicht zum Screening geeignet. Bei einem Vergleich der PCR MY09/11 und dem Hybridcapturetest II für die Nachweisgrenzen von 1,0, 0,5 und 0,2 Pikogramm HPV-DNA wurden in einer Untersuchung Kappa Indizes von 0,58, 0,58 und 0,7 erreicht, dies entspricht einer guten Übereinstimmung. Weitere Untersuchungen konnten auch eine sehr gute Übereinstimmung bei den unterschiedlichen PCR-Verfahren nachweisen [58,61].

Eine weitere Methode ist die In-situ-Hybridisierung. Es sind mehrere nicht radioaktive HPV Kits auf dem Markt, die zumeist mit HPV-Sondengemischen arbeiten (z.B. Dako, Paesel+Lorei, Kreatech). In zahlreichen Arbeitsschritten, wird zunächst die Sonde aufgetragen, die thermische Denaturierung von Sonde und zellulärer DNA und die Hybridisierung bei einer vorgegebenen Temperatur durchgeführt, anschließend finden Waschvorgänge und der immunhistochemische Nachweis der gebundenen Sonde statt. Die Morphologie des Präparates bleibt nicht immer erhalten. Für Läsionen mit niedriger Kopienzahl pro Zelle reicht dieses Verfahren oft nicht aus. Eine Steigerung der Empfindlichkeit ist durch Verwendung von radioaktiven Sonden möglich, diese sind jedoch nicht kommerziell erhältlich. Die In-situ-Hybridisierung wird wegen der hohen Kosten und der aufwendigen Durchführung vor allem zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt.

Serologische Untersuchungen, die im Rahmen von epidemiologischen Studien durchgeführt werden, zeigen dass es bei einer HPV-Infektion nur zu einer schwachen humoralen Immunantwort kommt. So konnten in der Studie von Dillner et al.[26] nur bei 37% mit einem Cervixcarcinom Antikörper gegen HPV 16, 18 oder 33 nachgewiesen werden. In einer Kontrollgruppe wurden diese Antikörper in 19% nachgewiesen. Daher ist die HPV-Serologie z.Zt. für diagnostische Zwecke nicht geeignet.

Radioaktive Nachweisverfahren, wie die Southern-Blot und Dot-Blot Systeme, galten für einen langen Zeitraum als Goldstandard in Fragen der Sensitivität und Spezivität in der HPV Diagnostik. Bei beiden Untersuchungen wird zunächst die DNA aus Zell-oder Gewebekulturen isoliert. Bei der Southern Blot Technik wird

die DNA dann mit Hilfe von Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente zerschnitten und in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen („geblottet“). Bei der Dot-Blot Technik wird die DNA direkt auf eine Membran aufgebracht. Im nächsten Schritt erfolgt die Hybridisierung mit HPV-spezifischen Sonden. Anschließend wird die Probe „gewaschen“ und es können die radioaktiv markierten Bereiche detektiert werden, womit der Nachweis von HPV-DNA in der Patientenprobe gelungen ist. Das Bandenmuster bei der Southern-Blot Hybridisierung gibt zusätzliche Auskunft über den HPV-Typ. Das Southern-Blot Nachweisverfahren ist sehr aufwendig und wird nur in Forschungsprogrammen eingesetzt. Die Dot-Blot Technik wurde verlassen, da es oft nicht gelang, schwache Signale von falsch-positiven Signalen zu unterscheiden [49]. Außerdem ist der Hybrid Capture Test II in Praktikabilität und Sensitivität überlegen.

Bei den bisher beschriebenen Techniken, war es immer das Ziel HPV-DNA nachzuweisen.

In einem neuem Nachweisverfahren wird nicht die HPV-DNA detektiert, sondern es werden mit Hilfe von gentechnisch hergestellten Antikörpern, HPV-spezifische Hüllproteine nachgewiesen. Bei diesem Nachweisverfahren wird die Probe, entweder ein Zellabstrich oder ein Paraffinschnitt, mit dem monoklonalem Antikörper inkubiert, anschließend wird die Probe mit einem weiteren Antikörper in Verbindung gebracht, dieser bindet nur an den ersten Antikörper und ist mit einem Enzymkomplex gekoppelt. Nach einem Waschvorgang, bei dem alle nicht gebundenen Komplexe entfernt werden, werden durch eine enzymatische Reaktion, alle Antikörper-Antikörperkomplexe farblich sichtbar gemacht und somit das Virusprotein nachgewiesen. Mit Hilfe eines ELISA kann im Anschluss eine quantitative Bestimmung erfolgen [45,65].

4.3. Die Rolle der HPV Infektion bei der Entstehung des Cervixcarcinoms

Erste Vermutungen, dass das Cervixcarcinom eine durch Geschlechtsverkehr übertragbare infektiöse Komponente hat, werden von Rigoni-Stern aus Rom geäußert. Er weist bereits 1842 auf das gehäufte Auftreten dieser Erkrankung bei Prostituierten hin. Ordensschwestern hingegen erkrankten nur extremen selten an diesem Tumor. Epidemiologische Untersuchungen über Risikofaktoren für die Entwicklung von Cervixcarcinomen haben seither eine lange Tradition. Historisch gehören zu den Risikofaktoren des Cervixcarcinoms: frühzeitiger Beginn der Sexualität, Promiskuität, Prostitution und abgelaufene Geschlechtskrankheiten, wie z.B. Treponema pallidum, Herpes simplex II. Weitere Risikofaktoren stellen der sozioökonomische Status, Nikotinkonsum, die Einnahme oraler Kontrazeptiva und Zustände einer Immunsuppression dar [11].

In über 80 Fallkontrollstudien wird über eine Korrelation zwischen dem Nachweis von HPV High-risk DNA und dem Vorkommen von schweren Dysplasien und invasiven Carcinomen berichtet [38].

Die Kenntnis darüber, dass bestimmte subtypen humaner Papillomviren eine karzinogene Wirkung haben und somit als Hauptrisikofaktor in der cervikalen Carzinogenese angesehen werden, läßt alle bis dahin bestehenden Überlegungen zu Risikofaktoren in einem anderen Licht erscheinen. So müssen alle bisher aufgeführten Risikofaktoren auf ihre Unabhängigkeit von einer HPV High-risk Infektion analysiert werden. Hierbei ist auch auszuschließen, ob die jeweiligen Faktoren als Kofaktoren bei der Akquirierung und Propagierung von HPV Infektionen wirken. Die kumulative Inzidenz beträgt für Frauen nach Beginn der sexuellen Aktivität bis zu 50%. HPV 16 ist hierbei der am häufigsten nachgewiesene Typ. Bei ca. 80% bildet sich die Infektion in 1-2 Jahren spontan zurück. Eine HPV 16 Infektion persistiert am häufigsten und birgt somit das größte Risiko für die Entstehung einer schweren Dysplasie oder sogar die Entstehung eines Carcinoms [82].

Im folgenden wird auf eine Auswahl von Studien eingegangen und es wird ihre Rolle im Zusammenhang bei der Entstehung des Cervixcarcinoms überprüft.

Burk und Mitarbeiter [13,37] zeigen in einer Studie aus dem Jahr 1996 und in einer weiteren Arbeit 1998 mit 600 gesunden College Frauen, dass die Anzahl von Sexualpartnern mit der Häufigkeit einer HPV Infektion korreliert. Der Nachweis einer HPV-Infektion wurde mit einer PCR- oder einer Southern blot Untersuchung geführt. Im Gesamtkollektiv beträgt der Anteil der HPV positiven 27%, das Durchschnittsalter beträgt 20 Jahre. In der Arbeit wird ein signifikanter Zusammenhang zwischen der HPV Infektion und folgenden Punkten gestellt:

- Frequenz von Geschlechtsverkehr in den letzten 6 Monaten
- Anzahl unterschiedlicher Sexualpartner
- Andere sexuell übertragbare Krankheiten (z.B. Chlamydien, Herpes, Gardnerella)

In dieser Studie hat das Einkommen der Familie keinen statistischen Einfluss auf das Risiko einer HPV High-risk Infektion.

In einer weiteren Arbeit dieser Arbeitsgruppe aus dem Jahre 1998, bei der 608 Collegestudentinnen beobachtet wurden, wurde der Verlauf einer HPV High-risk Infektion untersucht. Dazu wurden die Studentinnen über einen Zeitraum von 36 Monaten alle 6 Monate auf eine HPV High-risk Infektion kontrolliert. Der Nachweis wurde an Ausstrichpräparaten oder Vaginalspülungen mittels PCR oder Southern blot Hybridisation durchgeführt. Es wurde auf 20 verschiedene HPV High-risk Typen untersucht. Die mittlere jährliche Inzidenz der HPV High-risk Infektion lag bei diesem Kollektiv bei 14%. Ungefähr 60% aller Frauen waren in den 36 Monaten der Studiendauer einmal HPV High-risk positiv. Die mittlere Infektionsdauer lag bei 8 Monaten. In dieser Arbeit wurden weitere Risikofaktoren für eine HPV High-risk Akquirierung gefunden, dazu gehören:

- Altersabhängigkeit, erhöhtes Risiko für jüngere Frauen
- Zugehörigkeit zu ethnischen Randgruppen

- Erhöhter Alkoholkonsum
- Anzahl unterschiedlicher Sexualpartner in den letzten 6 Monaten

De Sanjose und Mitarbeiter [22] untersuchen in ihrer Arbeit aus dem Jahr 1997 den Zusammenhang zwischen dem Risiko einer Cervixcarcinomerkrankung und dem Sozialstaus. Es werden hierzu Daten aus Kolumbien und Spanien herangezogen, die in den Jahren 1985 bis 1987 gewonnen wurden. Das Cervixcarcinom kommt häufiger in niedrigen Sozialklassen vor [1,33,78]. Frauen ohne- oder mit geringer Schulausbildung haben in Spanien ein 3fach höheres Risiko an einem Cervixcarcinom zu erkranken. In Kolumbien ist dieses Risiko 5mal höher. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass ein niedriger sozialer Status auch ein anderes Sexualverhalten zu folge hat. Dazu zählt, dass die Ehemänner aus niedrigen Gesellschaftsschichten häufiger zu Prostituierten gehen und die Häufigkeit einer HPV Infektion signifikant höher ist. Frauen aus höheren Sozialklassen haben mehr unterschiedliche Sexualpartner, gehen aber häufiger zur Krebsvorsorge, so dass HPV induzierte Läsionen bereits im Stadium der Dysplasien erfasst werden und damit die Inzidenz des Cervixcarcinoms in dieser Gruppe niedriger ist. Bei Frauen aus niedrigen Sozialschichten wird seltener ein PAP Abstrich entnommen, so das seltener Vor- bzw. Frühstadien erkannt werden. De Sanjose kommt zu dem Ergebnis, dass der Häufigkeit des Prostituiertenkontaktes des Partners bei der Ausbreitung der HPV-Infektion und damit dem häufigeren Auftreten präneoplastischer und maligner Läsionen der Cervix in den niedrigeren Sozialschichten eine entscheidende Rolle zukommt. Sanjose und Mitarbeiter empfehlen deshalb, eine bessere Aufklärung dieser Bevölkerungsschicht, mit dem Ziel die Zahl der Vorsorgeuntersuchungen zu erhöhen.

Die Arbeit von Kenney JW [43] aus dem Jahre 1996 beschäftigt sich mit der Frage der ethnischen Zugehörigkeit und der Häufigkeit einer HPV Infektion. In der Arbeit wurden 302 Frauen aus 4 verschiedenen ethnischen Gruppen untersucht. Anglo women, African-American women, Hispanic und American Indian women. Die höchste HPV Rate weisen die Anglo women auf. In dieser

Arbeit werden die unterschiedlichen Sexualpraktiken, die für ein höheres HPV Infektionsrisiko sprechen, in Abhängigkeit der ethnischen Zugehörigkeit betrachtet. Dabei stellt sich heraus, dass die ethnischen Gruppen mit einer hohen HPV Infektionsrate, in einem jüngeren Alter mit dem Geschlechtsverkehr beginnen, häufiger wechselnde Sexualpartner haben, die Partner mit mehr anderen Frauen sexuellen Kontakt haben und somit der kausale Zusammenhang für die erhöhte HPV Infektionsrate hergestellt ist. Die ethnischen Unterschiede in den HPV Infektionsraten werden durch die bekannten Risikofaktoren erklärt.

In der Arbeit von de Sanjose, Munoz [23] aus dem Jahre 1996 wird der Sozialstatus und die Schulausbildung im Vergleich zu der Inzidenz des Cervixcarcinoms untersucht. Die Frauen die zur Auswertung herangezogen werden, sind die gleichen wie in der oben aufgeführten Arbeit [22]. Mit dieser Arbeit werden die bisher dargestellten Ergebnisse bestätigt. Je schlechter die Schulausbildung ist, desto höher ist die HPV Infektionsrate und desto höher ist das Risiko an einem Cervixcarcinom zu erkranken. Die Ursachen für dieses Ergebnis liegen an dem unterschiedlichen Sexualverhalten der Frauen, in Abhängigkeit von ihrer Schulausbildung.

In einer weiteren Arbeit von Hildesheim und Mitarbeitern aus dem Jahre 1993 [35], werden in einem Kollektiv von 404 Frauen die unterschiedlichen Risikofaktoren einer HPV- Infektion bewertet. Es werden die etablierten Risikofaktoren, wie Anzahl von Sexualpartnern, Alter beim ersten Geschlechtsverkehr, Einnahme oraler Kontrazeptiva und Sexualverhalten des Partners bestätigt. In dieser Arbeit wird zusätzlich eine höhere HPV Infektionsrate bei Schwangeren nachgewiesen, ein kausaler Zusammenhang kann jedoch nicht hergestellt werden. Es wird postuliert, dass ein veränderter Hormonspiegel in der Schwangerschaft eine latente HPV Infektion aktivieren kann. Ein veränderter Hormonspiegel könnte auch für die höhere HPV Infektionsrate bei Frauen unter einer Pilleneinnahme verantwortlich sein.

In einer weiteren Übersichtsarbeit aus dem Jahre 1992 von Brinton LA [11], werden alle möglichen Risikofaktoren die zur Entstehung eines Cervixcarcinoms

führen können aufgelistet und mit Hilfe von vorliegenden Arbeiten auf ihre Bedeutung und ihre Unabhängigkeit von einer HPV Infektion geprüft. Es werden sowohl die sexuellen Risikofaktoren diskutiert, als auch Themen wie religiöse Zugehörigkeit angesprochen. Des Weiteren wird das Sexualverhalten des männlichen Partners beleuchtet und dabei auch der Effekt einer Kondombenutzung überprüft. In der Zusammenfassung wird klargestellt, dass die Ergebnisse in der Literatur nicht ganz einheitlich sind und es in manchen Studien HPV unabhängige Risikofaktoren gibt, die in anderen Studien wiederum HPV abhängig sind. Fazit aus dieser Arbeit ist, dass man die HPV unabhängigen Risiken durch weitere Studien herausarbeiten muss, um somit die Frauen mit einer HPV Infektion zu identifizieren, die weitere Risikofaktoren zur Entstehung eines Cervixcarcinoms besitzen.

In einer jüngeren Arbeit aus dem Jahre 2000 von Shepherd [75] wird der direkte Zusammenhang zwischen der HPV Infektion und der Entstehung des Cervixcarcinoms hergestellt. Es werden die bekannten Risikofaktoren bestätigt. In dieser systematischen Übersichtsarbeit werden insgesamt 10 Arbeiten zitiert.

Alle zitierten Arbeiten besitzen sehr inhomogene Patientenkollektive, so dass die Arbeiten nicht direkt miteinander verglichen werden können und somit auch keine übergreifenden Aussagen getroffen werden. Allen Studien gemeinsam ist die Folgerung, dass durch ein verändertes Sexualverhalten, wie z.B. Benutzung von Kondomen und Reduzierung der Geschlechtspartner, eine Reduzierung der HPV Infektionsrate zu erreichen ist. Insbesondere profitieren sozialschwache Gruppierungen von einer adäquaten Aufklärung und Vorsorge.

4.3.1. Molekularbiologische Grundlagen der HPV Infektion

Inzwischen sind mehr als 100 verschiedene HPV-Typen bekannt, von denen mehr als 40 den Genitaltrakt infizieren [25]. Anfang der 80er Jahre wurden zwei neue HPV DNA-Isolate aus Cervixcarcinomen kloniert [9,27]. Dabei handelte es sich um Isolate von HPV 16 und 18. Zu diesem Zeitpunkt stellte man die ersten Zusammenhänge zwischen Tumorentstehung und der HPV-Infektion fest. Die HPV-Typen wurden in Risikogruppen eingeteilt, da sie unterschiedlich häufig und in unterschiedlichen Läsionen nachgewiesen wurden. Die Typen HPV 16 und 18, die zumeist bei prämaligen oder malignen Veränderungen nachgewiesen wurden, wurden als High-risk Typen bezeichnet. Die HPV-Typen 6 und 11 wurden als Low-risk Typen bezeichnet, da sie hauptsächlich in Läsionen mit niedrigem Entartungsrisiko nachgewiesen wurden, wie z.B. Genitalwarzen wie *Condylomata accuminata*. Der Entstehungsmechanismus war zu diesem Zeitpunkt jedoch noch völlig unklar. Ein kausaler Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und Entstehung eines Cervixcarcinoms war aufgrund dieser Befunde noch nicht gegeben.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass bei malignen Veränderungen, im Gegensatz zu prämaligen Veränderungen, die virale DNA häufig im Wirtsgenom integriert vorliegt [21,29]. Eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung kommt den viralen Onkogenen E6 und E7 zu.

Bei der Integration der viralen DNA kann es zu Umstrukturierungen und Deletion viraler Genomabschnitte kommen. Die Proteine E6 und E7, sowie die davorgeschaltete Kontrollregion (*ncr*) bleiben jedoch stets erhalten [74]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Gene in Tumoren und in davon abgeleiteten Cervixcarcinomzelllinien, in Proteine überschrieben werden. Somit bestand der Verdacht, dass die viralen Onkogene E6 und E7 eine Rolle bei der Tumorentstehung und bei der Aufrechterhaltung eines Tumors spielen. Dies konnte in der Zellkultur (*in vitro*) als auch in Versuchstieren (*in vivo*) bestätigt werden.

Die Tumorbildung und die Proliferation eines Tumors sind von der kontinuierlichen Expression dieser beiden Onkogene abhängig [81].

In weitergehenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die HPV-High-risk Typen, über o.g. Onkogene E6 und E7, die Möglichkeit besitzen, den Absterbeprozess primärer Zellen zu blockieren, diesen Vorgang bezeichnet man als Zellimmortalisierung und könnte eine frühe Stufe der Canzerogenese darstellen [34,52].

Es konnte dargestellt werden, dass das histologische Verhalten von Cervixcarcinomen direkt mit dem Expressionsniveau der Onkogene E6 und E7 korreliert [81]. Es ist anzunehmen, dass HPV-16 infizierte Zellen, in denen eine fehlende Kontrolle der Onkogene vorliegt, einen Wachstumsvorteil gegenüber den anderen Zellen besitzen. In Basalzellen einiger niedrigmaligner Läsionen wurde gezeigt, dass deutlich weniger E6 und E7 spezifische Transkripte vorliegen, als in höhergradigen Läsionen [28]. Zwischen hochgradigen Läsionen und invasiven Cervixcarcinomen ist diesbezüglich kein Unterschied festzustellen. Erstaunlicherweise sind Low-risk HPV Typen nicht oder nur sehr eingeschränkt in der Lage Keratinozyten zu immortalisieren.

Durch die Integration viraler DNA ins Wirtsgenom kann es zu einer Überexpression der viralen Onkogene E6 und E7 kommen. Eine virale Regulation der E6 Promotoraktivität wird über das E-2 Protein vermittelt. Durch Deletion des viralen E-2 Proteins wird diese Kontrollmöglichkeit ausgeschaltet. Dieser Vorgang ist für Cervixcarcinomzellen charakteristisch [86].

Die genauen molekularen Vorgänge und somit der Wirkungsmechanismus der viralen E6-und E7 Proteine, sind bisher nur teilweise aufgeklärt.

Bisher am besten untersucht ist die spezifische Komplexierung der viralen Onkoproteine an die zellulären Tumorsuppressorgene p53 und pRB. Diese beiden Zellproteine besitzen eine Schlüsselrolle in der Zellregulation und tragen zur Entscheidung bei, ob eine Zelle sich teilt und in den Differenzierungsprozess einght oder aufgrund von genetischen Veränderungen durch Apoptose

(programmierter Zelltod) entfernt wird [48]. DNA-Schädigungen führen normalerweise zu einer Zellzyklusarretierung in der G1 Phase. Dies ermöglicht der Zelle, den Schaden zu beheben und verhindert damit eine Mutation. Dieser Vorgang wird durch p53 und pRB gesteuert.

Folgende Vermutungen über den Wirkmechanismus der viralen Onkogene E6 und E7 werden postuliert:

Durch das virale Proteine E6 könnte es zu einer funktionellen Inaktivierung von p53 kommen, daraus würde eine genetische Instabilität der Zelle resultieren [31]. Ein möglicher Mechanismus über den das E7 Protein seine cancerogene Wirkung ausübt, ist die Freisetzung von E₂F, nachdem das E7-Protein an pRB gebunden hat. Daraus resultiert eine Genominstabilität mit einer daraus resultierenden Anhäufung von Mutationen, was wiederum eine maligne Progression vorantreibt [66,86]. Eine Ausschaltung von p53 und pRB führt letztendlich zu einer ungehinderten Zellteilung und damit zu einem Tumorwachstum.

Das cancerogene Potential der High-risk Papillomvirustypen kann jedoch durch die Inaktivierung dieser Proteine nicht komplett erklärt werden. Es wurde weiter gezeigt, dass ein mutiertes E6-Protein, welches nicht in der Lage ist p53 zu binden, Zelltransformationen hervorrufen kann. Desweiteren gibt es Hinweise für eine Interaktion zwischen E6 und einem kalziumbindenden Protein, was ebenfalls p53 unabhängig ist [16,60].

Diese molekularbiologischen Abläufe sind klare Zeichen für die cancerogene Wirkung der High-risk Papillomviren.

Zusätzlich zu diesen molekularbiologischen Kenntnissen kommen epidemiologische Daten. Aus vielen Untersuchungen geht klar hervor das eine Infektion mit einem HPV High-risk Typ eine erforderliche Voraussetzung für die Entwicklung eines Cervixcarcinoms darstellt, aber allein diese Infektion reicht nicht aus. Nur in wenigen Fällen führt eine HPV High-risk Infektion zu einem Cervixcarcinom und wenn dieser Fall eintritt, geschieht dies erst nach einer Latenzzeit von Jahren bis Jahrzehnten.

Untersuchungen haben gezeigt, dass ein maligner Tumor klonalen Ursprungs ist, d.h. das sich aus vielen viral infizierten Zellen, nur eine einzige Zelle sich zu einem Carcinom weiterentwickelt. In 90 % geht diese Tumorentstehung von den subzylindrischen Reservezellen aus, in 10 % sind es die Basalzellen des Plattenepithels. Es muss also nicht nur eine HPV High-risk Infektion vorliegen, sondern die Zelle die entartet muss zusätzlich genetische Veränderungen aufweisen, um ein invasives Wachstum zu ermöglichen.

Die Erkenntnis, dass humane Papillomviren als Carcinogene wirken und als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Cervixcarcinoms angesehen werden, ließ die bisher geltenden Risikofaktoren in einem anderen Licht und in einer anderen Bedeutung erscheinen. Die damals allgemein geltenden Risikofaktoren, wie z.B.: frühe Kohabitarche, niedriger sozioökonomischer Status, hohe Anzahl von unterschiedlichen Sexualpartnern, verringern sich ganz erheblich in ihrer Bedeutung, wenn die Assoziation zwischen dem Risikofaktor und einer HPV-Infektion kontrolliert wird. Dadurch kommt es zu einer Reduktion der Bedeutung der alten Risikofaktoren, da die HPV-Infektion verantwortlich für die Entartung an der Cervix uteri ist. Die Übertragung genitaler HPV Typen erfolgt primär durch Sexualkontakt [71], somit erhöht sich das Risiko für eine HPV Infektion mit den alten klassischen Risikofaktoren.

Der Häufigkeitssgipfel bei der HPV-Infektion liegt zwischen dem 20. und 24. Lebensjahr. Dabei liegt die Rate einer HPV-Infektion ohne Typisierung, d.h. alle genitalen HPV Typen, in dieser Altersklasse bei 20 bis 25 Prozent. Vergleicht man dies mit der Altersgruppe 35 bis 50 Jahre, so gibt es einen signifikanten Unterschied ($p < 0.001$). Die Infektionsrate in der Altersgruppe 35 bis 50 liegt bei unter 7 %. Vergleicht man die Infektionsrate nur für HPV 16 + 18 zwischen diesen Altersgruppen, so ergibt dies ebenfalls einen signifikanten Unterschied. Die Infektionsrate für die 20-24 jährigen liegt bei 8-10 %, in der Altersgruppe 35-50 Jahre liegt diese Rate bei unter 3,5 %. Diese Daten wurden 1993 [24,25] veröffentlicht und in weiteren Publikationen bestätigt. Das Patientinnenkollektiv

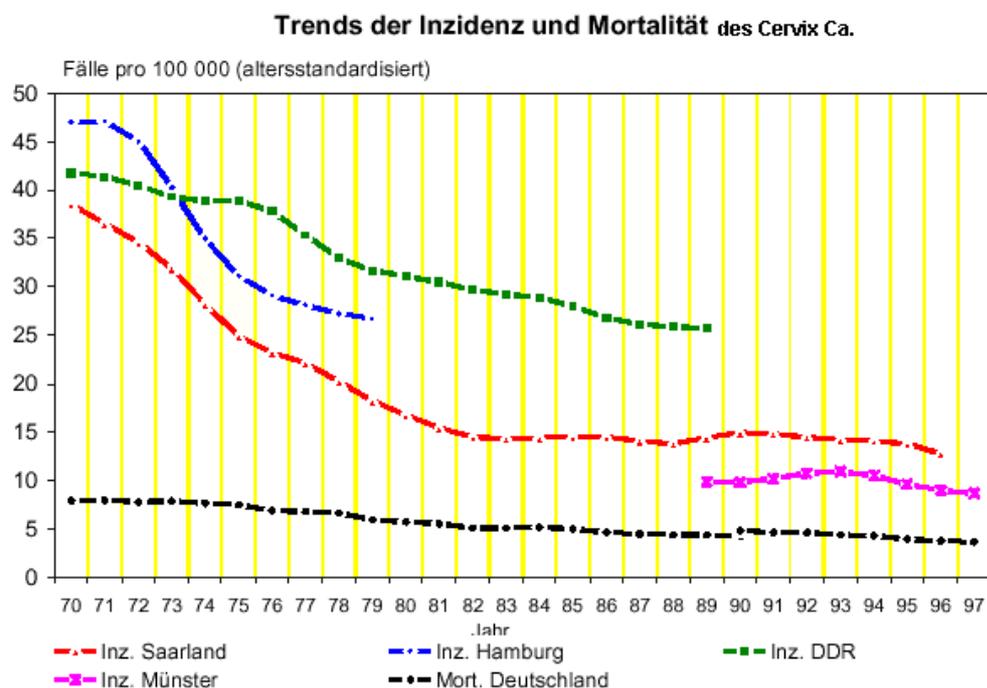
wurde dabei nicht in risikoadaptierte Untergruppen unterteilt und es handelte sich bei den Patientinnen um gesunde Probanden.

4.4. Krebsfrüherkennung in Deutschland

4.4.1. Ist-Zustand

1971 wurde in Deutschland für alle versicherungsberechtigten Frauen ein gesetzliches Krebsvorsorgeprogramm eingeführt. Dieses Programm beinhaltet die Inspektion und die Palpation, sowie die cytologische Abstrichuntersuchung aus dem inneren und äusseren Genitale der Frau. Ab dem 45. Lebensjahr schließt sich eine Stuhluntersuchung auf okkultes Blut, die rektale Tastuntersuchung und die Palpation der Brust an. Die bisherigen Auswertungen haben gezeigt, dass ein positiver Effekt auf die Früherkennung von Vorstufen und die Häufigkeit von Vulva, Vaginal –und Cervixcarcinom besteht [47]. So konnte nach Einführung des Screeningprogrammes eine deutliche Abnahme des invasiven Cervixcarcinoms festgestellt werden, wobei es hier zu einer Verschiebung fortgeschrittener Stadien (FIGO II – IV) zu Frühstadien (FIGO I) kam [12]. Daraus ergibt sich auch eine Abnahme der Inzidenz und der Mortalität. Einzelheiten können aus Abbildung 8 vom Robert Koch-Institut/Berlin entnommen werden.

Abb. 8



Aufgrund der besonderen topographischen Bedingungen und der damit verbundenen guten diagnostischen Zugänglichkeit ist das Cervixcarcinom der Tumor, bei dem eine Früherkennung und Prävention durch Identifizierung und Behandlung von Präcancerosen am besten möglich ist und praktiziert werden kann.

Über die Effizienz der Früherkennung beim Cervixcarcinom gibt es kontroverse Standpunkte. Es erkranken und versterben noch immer Frauen, die regelmäßig an der Vorsorgeuntersuchung teilgenommen haben, an Gebärmutterhalskrebs. Bei einwandfreier Abstrichtechnik, bei korrekter sofortiger Fixierung und bei Befundung in einem cytologischen Labor mit hoher Qualität soll die Cervixcytologie nach Literaturangaben eine Sensitivität von ca. 20%-50% und eine Spezifität von knapp unter 100% besitzen [73]. In der Literatur wird die Rate der falsch negativen Befunde allerdings mit erheblichen Schwankungsbreite von 2-50% angegeben [30,69]. So konnte in einer Arbeit von Schneider et al. aus dem Jahre 2000 gezeigt werden, dass 80% der in der Studie untersuchten Patientinnen die an einem Gebärmutterhalskrebs erkrankten, durch eine alleinige cytologische Untersuchung nicht erkannt worden wären. Demnach ist der konventionelle cytologische Abstrich als einmaliger Screeningtest nicht ausreichend sensitiv im Vergleich zum HPV Test, jedoch deutlich spezifischer [69].

Der Großteil der HPV Infektionen, circa 80 %, ob mit oder ohne klinische Zeichen, regrediert spontan in einem Zeitraum von 8 bis 16 Monaten [84]. Eine persistierende Infektion führt zur Entstehung einer Dysplasie und in seltenen Fällen zu einem invasivem Carcinom. HPV 16 Infektionen persistieren häufiger und länger als andere HPV Infektionen [36]. Schwergradige Präkanzerosen können aus leichten Präkanzerosen hervorgehen oder spontan ohne vorherigen Nachweis einer Dysplasie entstehen [46].

Die Inzidenz einer CIN III Läsion steigt bis zum 30. Lebensjahr an und fällt dann ab. Die Inzidenz des invasiven Cervixcarcinoms erreicht ein Plateau in der Altersgruppe 35-39 Jahre und steigt dann nur noch langsam an, um im Bereich des 55. Lebensjahres den Höhepunkt zu erreichen [67] siehe Abb. 7

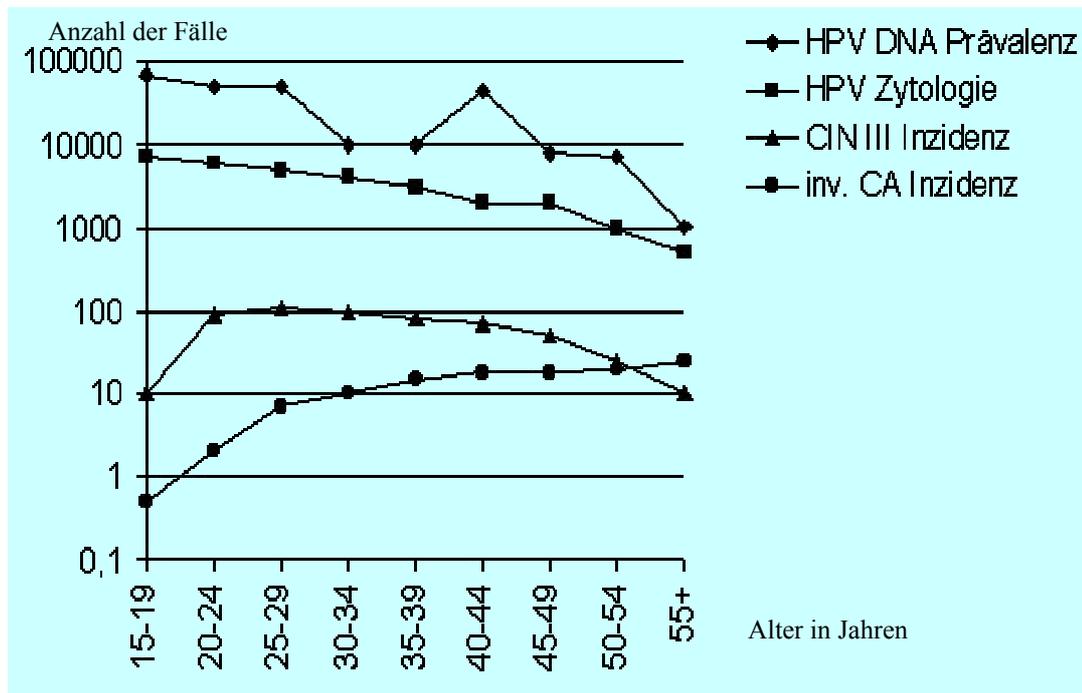


Abb 7: HPV-Infektion und Cervix-Neoplasie

Altersspezifische Verteilung von molekularbiologischem oder cytologischem HPV-Nachweis und Inzidenz cervikaler Neoplasien [67]

Zu falsch negativen Befunden kann es kommen bei falscher Entnahmetechnik des cervikalen Abstriches, falscher Fixierung des Abstrichmaterials oder falscher mikroskopischer Beurteilung des Abstrichs. Fehler bei der Abstrichentnahme entstehen häufig dann, wenn die Transformationszone invertiert ist und zusätzlich eine Cervikalstenose vorliegt, weil dann häufig keine Endocervikalzellen gewonnen werden können. In einigen Fällen einer Cervikalstenose kann die Vorbehandlung mit lokalen Östrogenen, bzw. Prostaglandinen, die Abstrichentnahme vereinfachen. Wenn das Abstrichmaterial nicht sofort nach der Entnahme korrekt fixiert wird, zeigen die Zellen eine schlechte Anfärbbarkeit und somit ist der Abstrich nur eingeschränkt beurteilbar. Die Wertigkeit des cytologischen Befundes hängt zusätzlich von den klinischen Angaben auf dem cytologischen Anforderungsbogen ab, da Faktoren wie Hormonsubstitution, Zyklusstand, liegendes IUP, Z. n. Chemo- oder Strahlentherapie sowie

Operationen einen Einfluss auf das Zellbild haben. Auffällige klinisch-morphologische Befunde sollten stets dem Cytologen übermittelt werden, um die Cytologie und die Klinik auf Plausibilität überprüfen zu können. Um die Sensitivität zu steigern und die falschnegativ Rate abzusenken ist nach geeigneten, additiven Methoden zu suchen.

Die Kolposkopie stellt eine Untersuchungsmöglichkeit dar, mit der die Sensitivität zur Erkennung cervikaler Veränderung erhöht werden kann. Diese Methode ist zeitaufwendig. Außerdem ist eine jahrelange Erfahrung des Untersuchers und ein hoher apparativer Aufwand erforderlich. Desweiteren ist die Reproduzierbarkeit nur schwierig zu gewährleisten.

Wünschenswert wäre also ein einfacher, reproduzierbarer Test, der die Sicherheit der cytologischen Diagnose für die Patientin erhöht. Außerdem sollte dieser Test bei der jetzigen ökonomischen Situation des Gesundheitswesens kostengünstig sein. Der HPV Test (Hybrid Capture II) stellt eine solche Möglichkeit dar. Wie oben bereits aufgeführt ist der Test gut reproduzierbar, besitzt eine hohe Sensitivität und ist einfach durchführbar.

4.4.2. Trend der Krebsvorsorge unter Einbezug der HPV Testung

Durch die Kombination einer HPV-Testung mit der cytologischen Untersuchung kann die Sensitivität der cytologischen Abstrichuntersuchung für den Nachweis von CIN II/III erhöht werden [62,70]. Es stellt sich also die Frage, bei welchen Patienten sollte ein HPV Test zusätzlich zur Cytologie oder allein in der Früherkennung durchgeführt werden. Das entscheidende Argument zur Einführung des HPV Tests wäre ein Zugewinn an Effizienz, das bedeutet, dass die Anzahl der Neuerkrankungen -und die Sterberate an Gebärmutterhalskrebs sich deutlich senken lässt.

Überlegungen sehen es als sinnvoll an, den HPV-Test bei folgenden Situationen einzusetzen. Bei abnormen cytologischen Befunden, wie PAP II w oder PAP IIID oder einer leichten Dysplasie und als Rezidivmarker bei der Verlaufskontrolle bei Zustand nach Konisation einer CIN III Läsion.

Am häufigsten wurde die HPV Testung bei Frauen mit leichtgradigen Veränderungen (PAP IIW, PAP III) untersucht, da die Mehrheit dieser Patienten einen histologischen Normalbefund vorweisen oder eine Läsion mit hoher Regressionspotenz besitzen. 70% aller CIN I zeigen eine spontane Remission [81]. In diesem Kollektiv kommt es jedoch in 5 bis 20 % zu einer CIN II oder CIN III [44,51,76]. Bisher wird bei diesen unklaren cytologischen Befunden, wie z.B. PAP IIID oder PAP II W bis zu 12-24 Monaten cytologisch kontrolliert bis eine histologische Abklärung erfolgt. In 23% der Fälle bei PAP III D liegt ein histologischer Befund CIN III vor, was in dem Kontrollzeitraum von 24 Monaten in Einzelfällen in ein invasives Cervixcarcinom übergehen kann [54]. Führt man bei diesen Patienten zeitgleich zum zytologischen Abstrich auch eine HPV-Diagnostik durch, so können die Patienten mit einer HPV High-Risk Infektion, die ein deutlich höheres Risiko für die Entstehung einer CIN III besitzen, sofort einer histologischen Abklärung zugeführt werden. Somit bleibt, nach einem negativen HPV High-risk Nachweis, das Erkrankungsrisiko über einen längeren Zeitraum gering und die Patienten könnten in größeren Zeitabständen kontrolliert werden. Dies wäre eine Möglichkeit die Kosteneffizienz zu steigern.

4.5. Prävention durch HPV-Vakzinierung

Wie alle anderen Virusinfektionen auch, ruft die HPV-Infektion sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunreaktion hervor. So werden Antikörper gegen frühe und späte HPV Proteine bei Patienten mit HPV-Infektionen und HPV-assoziierten Neoplasien aber auch bei gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen [32]. Die Antikörper scheinen zwar den Verlauf der Infektion nicht zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass z.B. der Nachweis von Antikörpern gegen HPV 16 E7 mit HPV-Assoziierten malignen Erkrankungen korreliert [41].

Der Nachweis von Antikörpern gegen virale Strukturproteine gelang auch in Seren von HPV High-risk positiven Patienten. Es konnte bisher jedoch keine Korrelation zwischen dem Antikörperstatus und der Regression oder dem Wiederauftreten einer HPV induzierten Läsion dargestellt werden [5,17,55].

Eine spontane Abheilung einer HPV induzierten Läsion, ist zumeist mit einer Infiltration mit CD4- und/oder CD8 positiven T-Lymphozyten in den nicht malignen Tumoren verbunden. Durch Beobachtungen bei immunsupprimierten Patienten, bei denen HPV assoziierte prä-maligne und maligne Läsionen gehäuft auftreten, weist darauf hin, dass die zelluläre Immunantwort ausschlaggebend für die Kontrolle dieser Erkrankungen ist [3].

In Tiermodellen werden entweder nach Infektion oder nach Immunisierung mit rekombinanten Viruskapsidproteinen, neutralisierende Antikörper produziert. Diese Antikörper schützen bei späterer Virusinokulation und verhindern die Etablierung einer Virusinfektion. Die Antikörper sind für individuelle Papillomvirustypen spezifisch [2,40,50] Mittlerweile konnten virusähnliche Partikel (VLP) synthetisch hergestellt werden. Kaninchen, die mit diesen VLP geimpft werden, produzieren neutralisierende Antikörper und sind somit offenbar vor einer HPV-Infektion geschützt [10,39]. HPV induzierte Tumoren können durch die Vakzinierung zur Regression gebracht werden.

Die ersten Erfahrungen mit einer therapeutischen Impfung stammen aus dem Jahre 1996. Dabei wurde rekombinantes Vakzina-Virus (TA-HPV), das die E6- und E7 Proteine von HPV 16 und 18 exprimiert, bei Patientinnen mit einem invasiven Cervixcarcinom eingesetzt [6]. In einer weiteren Untersuchung erhielten Patientinnen nach einer Genitalwarzenbehandlung eine Vakzinierung. Alle 27 Patientinnen waren nach 4 Monaten krankheitsfrei.

In einer Untersuchung aus dem Jahre 2001 wurde die Verträglichkeit einer VLP Vakzine untersucht. Bei allen Probanden war nach der zweiten Gabe eine Immunantwort nachweisbar. Die Verträglichkeit war besser, wenn bei der Applikation keine Zusatzstoffe verwendet wurden [18]. Auf den Antikörpertiter haben die Zusatzstoffe jedoch keinen Einfluss.

Es laufen zur Zeit weitere Studien mit therapeutischen Impfstoffen und mit prophylaktischen Impfungen. Bisher sind jedoch nur Impfungen gegen einen bestimmten HPV Typ möglich. Man geht z. Zt. davon aus, dass in ca. 5 Jahren ein Impfstoff gegen HPV 16 kommerziell zur Verfügung steht.

Es bestehen langfristig berechtigte Hoffnungen, dass ein Grossteil der HPV induzierten Läsionen, durch eine prophylaktische Impfung vermieden werden können. Allerdings wird es Jahrzehnte dauern, bis die Effektivität eines vorbeugenden Impfstoffes bewiesen werden kann, denn das bedeutet dass hierzu junge Mädchen noch vor dem ersten Sexualverkehr geimpft werden müssten, um zu ermitteln, ob in dieser Gruppe die Erkrankungsrate an Cervixcarcinom nach 20-30 Jahren geringer ausfällt.

5. Fazit für die Praxis

Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten, werden die bisher geltenden Aussagen bezüglich der HPV High-risk Infektion als Voraussetzung für eine CIN III oder eine höhergradige Läsion bestätigt. Die Cervixcytologie alleine erkennt nicht alle höhergradigen Läsionen. In dem hier vorgestellten Kollektiv wären 8 CIN III Fälle durch die Cytologie allein nicht entdeckt worden. Durch die additive HPV Diagnostik sind diese Fälle aufgefallen und somit erkannt worden. Durch die HPV Diagnostik kann die Sensitivität der Cytologie bei höhergradigen Läsionen verbessert werden. Somit kann das Vorsorgescreening für die Patientinnen- und somit die Sicherheit bei höhergradigen oder unklaren cytologischen Befunden optimiert werden.

Die Kosten der gegenwärtigen Vorsorgeprogramme können durch einen HPV Test möglicherweise reduziert werden. Der Zugewinn an Sensitivität und der hohe negative Vorhersagewert, der die Untersuchungsintervalle vergrößern könnte, ließe die Kosten eventuell sinken. Z.Zt. gibt es dazu jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Ein Zugewinn an Effizienz im primären Screening durch den HPV Test mit Reduzierung der Neuerkrankungs- und Sterberate am Gebärmutterhalskrebs ist bisher noch nicht erfolgt.

Die einfach durchführbare HPV Testung ist ein Verfahren zur besseren Risikoeinschätzung für eine Patientin mit einem auffälligem cervixcytologischen Befund. Eine HPV Diagnostik als Routineuntersuchung bei allen Frauen, unabhängig vom cervixcytologischen Befund, würde eine hohe Quote asymptomatischer Papillomvirusträger aufdecken, ohne das diese Patientinnen einer operativen Behandlung oder einer anderen Therapie zugeführt werden müssten bzw. könnten. Ein solches Vorgehen würde eine erhebliche Verunsicherung und psychogenen Stress bei der Patientinnen bewirken.

Die Indikation zum therapeutischen Eingriff muß sich deshalb nach wie vor in erster Linie nach cytologischen- und histologischen Kriterien richten und kann durch die Virustypisierung gut ergänzt werden.

Diese Situation würde sich für die Patientin ändern, wenn in Zukunft die Möglichkeit einer Vakzinierung als Prävention oder als Behandlung HPV High-risk positiver Patientinnen besteht. Dann muß die routinemäßige HPV Testung neu diskutiert werden.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Versicherungskollektive (gesetzliche Krankenkasse versus privater Krankenkassen) kann ein signifikanter Unterschied bei der HPV High-risk Infektionsrate nachgewiesen werden. So lässt sich eine HPV High-risk Infektion bei den gesetzlich versicherten Patientinnen 3 mal häufiger nachweisen als bei den privat versicherten Patientinnen. In der aktuellen Literatur ist bisher keine Arbeit bekannt die sich ausdrücklich mit der Beziehung des Versichertenstatus zum HPV-Status beschäftigt. Es gibt jedoch Literatur, die sich mit dem HPV Status und dem sozioökonomischen Status auseinandersetzt. Vergleicht man die hier vorgelegten Ergebnisse mit diesen Literaturdaten, so entspricht der Trend in den unterschiedlichen sozialen Klassen, dem in den unterschiedlichen Versicherungsgruppen. So wird in verschiedenen Studien herausgearbeitet, dass die sozioökonomisch benachteiligten Personengruppen, ein erhöhtes Risiko für eine HPV High-risk Infektion aufweisen. Vergleiche dieser Art sind nur mit aller größter Zurückhaltung zu machen, da man aus dem Versicherungsstatus keinen direkten Rückschluß auf den Sozialstatus ziehen sollte. Hier wären weitere epidemiologische und sozialmedizinische Untersuchungen und Analysen erforderlich.

Eines der größten Probleme der Krebsvorsorge in Deutschland besteht nicht in der geringen Sensitivität der Cervixcytologie, sondern darin, dass Frauen dieses für Sie kostenlose Angebot nur unzureichend wahrnehmen. Weitere Untersuchungen sollten klären, ob die Frauen, die nicht an dem Vorsorgeprogramm teilnehmen, durch einen selbstentnommenen HPV-Test erreicht werden können und bei HPV High-risk Nachweis zur Krebsvorsorge motiviert werden könnten.

Eine valide Evaluierung, wie der HPV-Test im Rahmen der Krebsvorsorge zu bewerten ist, muss durch weitere prospektiv angelegte Studien erarbeitet werden. Bis dahin kann der routinemäßige Einsatz des HPV-Test im Rahmen der

Krebsvorsorge nicht empfohlen werden und die Cervixcytologie bleibt die Methode der Wahl bei den Screeninguntersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

1. Baquet CR, Horm JW, Gibbs T, Greenwald P (1991) Socioeconomic factors and cancer incidence among blacks and whites. *J Natl Cancer Inst* 83(8): 551-7
2. Bell JA, Sundberg JP, Ghim SJ, Newsome J, Jenson AB, Schlegel R (1994) A formalininactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model. *Pathobiology* 62: 194–198
3. Benton C, Shahidullah H, Hunter JAA (1992) Human papillomavirus in the immunosuppressed. *Papillomavirus Report* 3: 23–26
4. Bollen LJ, Tjong AHS et al (1999) Prediction of recurrent and residual cervical dysplasia by human papillomavirus detection among patients with abnormal cytology. *Gynecol Oncol* 72: 199–201.
5. Bonnez W, Kashima HK, Leventhal B, Mounts P, Rose RC, Reichman RC, Shah KV (1992) Anti-body response to human papillomavirus (HPV) type 11 in children with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis (RRP). *Virology* 188: 384–387.
6. Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M et al. (1996) A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 347: 1523–1527

7. Bosch FX , Munoz N, de Sanjose S (1994) Importance of human papillomavirus endemicity in the incidence of cervical cancer: an extension of the hypothesis on sexual behavior. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3(5): 375-379
8. Bosch FX, Manos M, Munoz N (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl. Cancer Int.* 87: 796-802
9. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3: 1151-1157
10. Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL et al. (1995) Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 69: 3959–3963
11. Brinton LA, et al. (1992) Epidemiology of cervical cancer-overview. *IARC Sci Publ, Lyon* 119: 3-23
12. Bryans RE, Boyles DA, Fidler HK (1964) The influence of a cytological screening program upon the incidence of invasive squamous cell carcinoma of the cervix in British Columbia. *Am J Obstet Gynecol* 88: 898

13. Burk RD, Ho Gy, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R (1996) Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis* 174(4): 679-689
14. Champion MJ, Reid R (1990) Screening for gynecologic cancer. *Obstet Gynecol Clin N Am* 17: 695-727
15. Castle PE, Lorincz AT, Mielzynska-Lohnas I, Scott DR, Glass AG, Sherman ME, Schussler JE, Schiffman M (2002) Results of human papillomavirus DNA testing with the hybrid capture 2 assay are reproducible. *J Clin Microbiol.* 40(3):1088-90
16. Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ (1995) Interaction of papillomavirus E6 oncoprotein with a putative calcium-binding protein. *Science* 26 : 529-531
17. Christensen ND, Kreider JW, Shah KV, Rando RF (1992) Detection of human serum anti-bodies that neutralize infectious human papillomavirus type 11 virions. *J Gen Virol* 73: 1261–1267
18. Clavel C, Masure M, Putaud I, Thomas K, Bory JP, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P (1998) 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* 51(10): 737-40.

19. Clayton D, HarroCD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karron RA, Dillner J, Schiller JT, Lowy DR (2001) Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 93(4):284-92
20. Cox JT (1995) HPV DNA testing: clinical boon or boondoggle? *Lancet* 346(8977): 717-718
21. Cullen AP, Reid R, Campion M (1991) Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithel and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 65(2): 606-612
22. de Sanjose S, Bosch FX, Munoz N (1997) Social differences in sexual behaviour and cervical cancer. *IARC SciPubl* 138: 309-17
23. de Sanjose S, Bosch FX, Munoz N (1996) Socioeconomic differences in cervical cancer : two casecontrol studies in Colombia and Spain. *Am J Public Health* 86(11): 1532-1538
24. de Villiers EM(1994)Human pathogenetic papillomavirus types: an update. *CurrTop Microbiol Immunol* 186:1-12
25. de Villiers EM (2001) Taxinomic classification of Papillomavirus. *Papillomvirus Report* 12: 57-63

26. Dillner J, Lehtinen M, Björge T, Luostarinen T, Youngman L, Jellum E, Koskela P, Gislefoss RE, Hallmans G, Paavonen J, Sapp M, Schiller JT, Hakulinen T, Thoresen S, Hakama M (1997) Prospective seroepidemiologic study of human papillomavirus infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 89:1293–1299
27. Duerst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci* 80(12): 3812-5
28. Duerst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H (1992) Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* 189: 132–140
29. Duerst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L (1985) The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J Gen Virol* 66: 1515-1522
30. Fetherston WC (1983) False-negative cytology in invasive cancer of the cervix. *Clin Obstet Gynecol* 26(4): 929-937
31. Fritsche M, Haessler C, Brandner G (1993) Induction of nuclear accumulation of the tumor suppressor protein p53 by DNA damaging agents. *Oncogene* 8: 307-318

32. Galloway DA, Jenison SA (1990) Characterization of the humoral immune response to genital papillomaviruses. *Mol Biol Med* 7(1): 59-72
33. Hakama M, Hakulinen T, Pukkala E, Saxen E (1982) Risk indicators of breast and cervical cancer on ecologic and individual levels. *Am J Epidemiol* 116(6): 990-1000.
34. Hawley Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT (1989) HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 8: 3905–3910
35. Hildesheim A, Gravitt P, Schiffman MH, Kurman RJ (1993) Determinants of genital human papilloavirus infection in low-income women in Washington D.C.. *Sex Transm Dis* 20(5): 279-85
36. Hildesheim A, Schiffmann MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawler P, Shermann ME, et al. (1994) Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect. Dis* 169(2): 235-240
37. Ho Gy, Bierman R, Beardsley L, Chee J, Burk RD (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338(7):423-8.
38. IARC Monograph (1995) IARC monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses. IARC,Lyon, France, p 64

39. Jansen KU, Rosolowsky M, Schultz LD, Markus HZ, Cook JC, Donnelly JJ, Martinez D, Ellis RW, Shaw AR (1995) Vaccination with yeast-expressed cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) virus-like particles protects rabbits from CRPV-induced papilloma formation. *Vaccine* 13(16): 1509–1514

40. Jarrett WF, Smith KT, O’Neil BW, Gaukroger JM, Chandrachud LM, Grindlay GJ, McGarvie GM, Campo MS (1991) Studies on vaccination against papilloma-viruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. *Virology* 184(1): 33–42

41. Jochmus I, Gissmann L (1997) Immunological aspects of E6 and E7: tools for diagnosis and therapeutic intervention. *Molecular Biology Intelligence Unit, Landes Bioscience*, 137-165

42. Kainz C, Tempfer C, Gitsch G, Heinzl H, Reinthaller A, Breitenacker G (1995) Influence of age and human papillomavirus-infection on reliability of cervical cytopathology. *Arch Gynecol Obstet* 256(1):23-8

43. Kenny JW (1996) Ethnic differences in risk factors associated with genital human papillomavirus infections. *J Adv Nurs* 23(6): 1221-1227

44. Kinney WK, Manos MM, Hurley LB, Ransley JE (1998) Where's the high-grade cervical neoplasia? The importance of minimally abnormal papanicolaou diagnoses. *Obstet Gynecol*; 91(6): 973–976.

45. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self assembles into viruslike particles that are highly immunogenic. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 89:12180-12184
46. Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK (1988) Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *EpidemiolRev* 10: 122-163
47. Küppers V, Schnürch HG (1997) Aktueller Stand der Krebsfrüherkennung des weiblichen Genitales. *Der Gynäkologe* 30: 624-630
48. Levine AJ (1993) The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 62: 623-651
49. Langosch LM, Riethorf S, Park TW, Natütlicher Verlauf der HPV Infektion- Nutzen der HPV Analytik in der Zervixdiagnostik; 1999 20: 15-24 *Der Pathologe*, Springer-Verlag
50. Lin YL, Borenstein LA, Selvakumar R, Ahmed R, Wettstein FO (1992) Effective vaccination against papilloma development by immunization with L1 or L2 structural protein of cottontail rabbit papillomavirus. *Virology* 187(2): 612–619
51. Manos MM, Kinney WK, Hurley LB, [Sherman ME](#), [Shieh-Ngai J](#), [Kurman RJ](#), [Ransley JE](#), [Fetterman BJ](#), [Hartinger JS](#), [McIntosh KM](#), [Pawlick GF](#), [Hiatt RA](#) (1999) Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal papanicolaou results. *JAMA* 281(17): 1605–1610

52. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for trans-formation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63: 4417–4421
53. Muir C, Waterhouse J, Mack T (1987) Cancer incidence in five continents. IARC, Lyon,p5
54. Nasiell K, Roger V, Nasiell M (1986) Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 67: 665–669
55. Nonnenmacher B, Hubbert NL, Kirnbauer R, Shah KV, Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Viscidi R, Lowy DR, Schiller JT (1995) Serologic response to human papillomvirus type 16 (HPV-16) virus-like particles in HPV-16 DNA-positive invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. *J Infect Dis* 172(1): 19–24
56. Papanicolaou GN (1942) A new procedure for staining vaginal smears. *Science* 95: 438
57. Petry KU, Böhmer G, Linge G, Glaubitz M (1996) Die HPV-DANN Hybridisierung ermöglicht eine Differenzierung zervikaler Läsionen bei PAP III Zytobefunden. *Geburtsh. und Frauenheilkunde* 56 509-512

58. Peyton CL, Schiffmann M, Lörincz AT (1998) Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 36: 3248-3254;
59. Pfleiderer A (1996) Tumorscreening in der Gynäkologie. *Der Gynäkologe* 29: 243-250
60. Pim D, Storey A, Thomas M, Massimi P, Banks L (1994) Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene* 9(7): 1869-1876
61. Qu WM, Jiang G, Cruz Y (1997) PCR detection of human papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 35: 1304-1310]
62. Reid R, Greenberg MD, Lörincz A, Jenson AB, Lavery CR, Husain M, Daoud Y, Zado B, White T, Cantor D (1991) Should cervical cytologic testing be augmented by cervicography or human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection? *Am J Obstet Gynecol* 164: 1461–1469
63. Richart RM (1973) Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu*; 8:301-28

64. Sachs Lothar (1999) Der Chi-Quadrat Test und Der Exakte Test in Sachs Lothar (Hrsg.) *Angewandte Statistik*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 9. Auflage. Seite 477ff und 449ff.
65. Sapp M; Kraus U, Volpers C, Snijders PJF, Walboomers JM, Streeck RE (1994) Analysis of type-restricted and cross-reactive epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 and in infected tissues using monoclonal antibodies to the major capsid protein *J Gen Virol*.75: 3375-3383
66. Scheffner M, Romanczuk H, Muenger K, Huibregtse JM, Mietz JA (1994) Function of human Papillomavirus proteins. *Curr Top Microbio Immunol* 186:83-99
67. Schiffman MH (1992) Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 84(6): 394-8
68. Schiffmann MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME (1993) Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 85: 958-964
69. Schneider A, Hoyer H, Lotz B, Leistritz S, Kühne-Heid R, Nindl I, Müller b, Haerting J, Dürst M (2000) Screening for High-Grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for High-risk HPV, routine Cytology or colposcopy. *Int.J Cancer* 89: 529-534

70. Schneider A, Zahm DM, Kirchmayr R, Schneider V (1996) Screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: validity of cytology study, cervicography and human papillomavirus detection. *Am J Obstet Gynecol* 174: 1534–1541
71. Schneider A. (1994) Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirology* 37: 201-214
72. Schneider A. (2000) Einführung in Ätiologie, Epidemiologie, Klinik, Diagnostik, Staging, Therapie, Prognose, Prävention sowie Nachsorge präkanzeröser und invasiver Veränderungen der Cervix uteri CD ROM.
73. Schwartz SM, Weiss NS (1986) Increased incidence of adenocarcinoma of the cervix in young women in the United States. *Am J Epidemiol* 124: 1045-1047
74. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314: 111-114
75. Shepherd J, Peersman G, Weston R, Napuli I (2000) Cervical cancer and sexual lifestyle: a systematic review of health education interventions targeted at women. *Health Educ Res* 15(6): 681-694
76. Solomon D, Schiffman M, Tarone R (2001) Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of

undetermined significance: Baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 93: 293–299

77. Statistisches Bundesamt (1998) Gesundheitsberichterstattung für Deutschland, Gesundheitsbericht des Bundes. Statistisches Bundesamt
78. Tomatis L (1992) Poverty and cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1(3):167-75.
79. Van der Graaf Y, Vooijs GP, Gaillard HLJ (1987) Screening errors in cervical cytologic screening. *Acta Cytol* 31: 434-438
80. Vesterinen E, Forss M, Nieminen U (1989) Increase of cervical adenocarcinoma: a report of 520 cases of cervical carcinoma including 112 tumors with glandular elements. *Gynecol Oncol* 33(1): 49-53
81. von Knebel Doeberitz M, zur Hausen H (1992) Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 antisense RNA. *IntJ Cancer* 51: 831-834
82. Woodman CB, Collins S, Winter H (2001) Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 357:1831-1836
83. Wright TC, Sun XW, Koulos J (1995) Comparison of management algorithms for the evaluation of women with low-grade cytologic abnormalities. *Obstet Gynecol* 85: 202–210

84. Ylinen K, Nieminen U, Forss M, Widholm O, Karjalainen O (1985) Changing pattern of cervical carcinoma: a report of 709 cases of invasive carcinoma treated in 1970-1974. *Gynecol Oncol* 20(3):378-86
85. zur Hausen H (1991) Viruses in human cancers. *Science* 254: 1167-1173
86. zur Hausen H (1994) Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbio Immun* 186:131-156

7. Danksagung

Danksagung für die Überlassung des Materials an das Dr. Gottfried Reuter Institut/Lemförde unter der Leitung von Dr. Dr. Gerhard Ey und dem Chefarzt Prof. Dr. R. H. Krech, pathologisches Institut im Klinikum Osnabrück. Zusätzlich Dank an Prof. R. Zielke für die Beratung bei der statistischen Aufarbeitung.

8. Lebenslauf

- Name: Bernd Holthaus
- Geb.: 29.04.1970 in Georgsmareinhütte
- Familienstand: verheiratet mit Katharina Holthaus, geb. Ey.
3 Söhne, Karl, Anton und Oskar
- Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

- 1990 Abitur am Graf-Stauffenberg Gymnasium Osnabrück
- April 1991 Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität in Berlin
- August 1993 Wechsel nach dem 1. klinischen Semester an die medizinische Fakultät der Universität Hamburg. In der Zeit des klinischen Studiums zahlreiche Famulaturen in den Fächern Chirurgie, Innere Medizin, Anästhesie, Gynäkologie, Orthopädie, Unfallchirurgie.
- März 1997 2. Staatsexamen an der Universität Hamburg mit der Note 2
- Oktober 1996 praktisches Jahr mit in 1 Tertial in St. Moritz/CH Chirurgie/Unfallchirurgie, 1 Tertial Gynäkologie am MHO und 1 Tertial Innere Medizin am MHO
- November 1997 3. Staatsexamen an der MH Hannover mit einer Gesamtnote von 2,33.
- Januar 1998-Juni 1999 Arzt im Praktikum in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Marienhospitals Osnabrück
- Juni 1999. September 2002 Assistenzarzt in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Marienhospitals Osnabrück
- Seit Oktober 2002 Oberarzt in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Osnabrück
- Januar 2003 Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe