

Aus der Klinik für Gynäkologie
mit Schwerpunkt Gynäkologische Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Qualitätskontrolle durch Nachuntersuchung diskrepanter Ergebnisse bei
einem genotypisierenden HPV-Test

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lena Sophie Sperber

aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Humane Papillomviren	5
1.1.1 Klassifikation	5
1.1.2 Struktur und Aufbau	6
1.2 Zervixkarzinom	7
1.2.1 Epidemiologie	7
1.2.2 Ursachen	8
1.2.3 Entstehung und Verlauf	9
1.2.4 Nomenklatur.....	11
1.2.5 Symptome.....	12
1.2.6 Diagnostik	13
1.2.7 Therapie und Heilungschancen	16
1.2.8 Prävention.....	20
2 Herleitung der Fragestellung.....	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Rekrutierung von Patientinnendaten und -proben	23
3.2 Ein- und Ausschlusskriterien	23
3.3 Multimetrix und Luminexanalyse	24
3.3.1 Multimetrix-PCR.....	24
3.3.2 HPV-Typisierung und Quantifizierung mit Luminex.....	26
3.4 Ermittlung seltener HPV-Typen	28
3.5 E7-Multiplex-PCR.....	28
3.6 Reevaluation zytologischer Befunde	29
4 Ergebnisse	30
4.1 Ergebnisse im Überblick.....	30
4.2 Patientinnenkollektiv im Überblick	32
4.3 Reevaluation mit Multiplex HPV Genotyping Kit.....	33
4.4 Reevaluation mit erweitertem HPV-Spektrum	36
4.5 Ergebnisse der E7-Multiplex-PCR	38
4.6 Reevaluation der zytologischen Abstriche.....	40

Inhaltsverzeichnis

4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	42
5	Diskussion.....	45
5.1	Qualitätssicherung der Testmethoden.....	45
5.2	HPV-Testmethoden im Vergleich	46
5.3	Ergebnisse und Grenzen der HPV-Testmethoden	48
5.4	HPV-Mischinfektionen	50
5.5	Pap-Abstrich und HPV-Test als Screeninguntersuchung	50
5.6	Integration des HPV-Genoms in die Wirts-DNA	53
5.7	HPV-Prävalenz bei pathologischer Zytologie und Histologie.....	55
5.8	Ausblick.....	56
6	Literaturverzeichnis	59
	Abkürzungsverzeichnis.....	65
	Tabellenverzeichnis.....	68
	Abbildungsverzeichnis.....	69
	Anhang	70
	Eidesstattliche Versicherung	82
	Lebenslauf.....	83
	Danksagung	84

Zusammenfassung

Hintergrund: Das Zervixkarzinom ist mit 530.000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die zweithäufigste Karzinomerkrankung bei Frauen. Mehr als 270.000 Frauen sterben jährlich daran. Besonders betroffen sind Frauen in Ländern ohne oder mit unzureichenden Früherkennungsmaßnahmen. Eine große Rolle in der Entwicklung zervikaler Dysplasien spielt die Infektion mit sexuell übertragbaren Hochrisiko(HR)-HPV-Typen. Ein Ziel der Prävention von Zervixkarzinomen ist, HPV-Infektionen und zervikalen Dysplasien vorzubeugen, rechtzeitig zu erkennen und zu behandeln.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit 160 Patientinnen, die trotz pathologischer Zytologie oder Histologie einen negativen HPV-Test aufwiesen. Durch die Nachuntersuchung soll eine Erklärung und eventuell Korrektur dieser diskrepanten Ergebnisse eines Genotypisierungstests für Humane Papillomviren erfolgen.

Methoden: Eingeschlossen wurden Patientinnen mit einem Pap-Abstrich von \geq Pap IIIa und/oder einer CIN bei negativem HPV-Befund aus der laborinternen HPV-Genotypisierung mittels Diassay (GP-5+/6+-PCR und Luminex-basierte Messung). Von 1.254 Proben wurden 160 HPV-negative zur Zytologie/Histologie diskrepante Proben mit Hilfe des Multiplex HPV Genotyping Kit for Research in Epidemiology auf 24 HPV-Typen untersucht. Hierbei wurden in 102 Proben HPV identifiziert. 57 weiterhin HPV-negative Proben wurden in Labore nach Jena und Heidelberg verschickt. In Heidelberg wurden die Proben durch ein multiplexes Analysesystem auf 55 HPV-Typen untersucht und eine Einschätzung der Viruslast vorgenommen. In Jena wurden die Proben in Hinblick auf das Onkogen E7 auf die sieben häufigsten HR-HPV-Typen untersucht, zusätzlich wurde ein GP-5+/6+-PCR-EIA durchgeführt. Im Anschluss evaluierten drei unabhängige Gutachter die zugehörigen Pap-Präparate erneut zytologisch.

Ergebnisse: In 102 der 160 HPV-negativen Proben (63,75 %) wurde in Berlin unter Anwendung des Multimetrix-Kits HPV gefunden und diese daraufhin als falsch-negativ charakterisiert. Eine negative Probe schied aufgrund von Materialmangel aus. In den anderen 57 weiterhin negativen Proben fand man in Jena in 13 Proben HPV, 44 blieben negativ. 28 Proben wurden in Heidelberg HPV-positiv getestet, zum Teil mit seltenen nicht im Multimetrix-Test enthaltenen Typen. 26 blieben negativ für HPV, in drei Proben wurden weder HPV noch β -Globin (menschliche DNA) nachgewiesen, sie waren

dadurch nicht evaluierbar. Bis auf zwei Pap-Abstriche wurden alle zumindest durch einen Gutachter im Schweregrad heruntergestuft.

Schlussfolgerung: Die Diskrepanz zwischen pathologischer Zytologie oder Histologie und negativem HPV-Befund konnte in den meisten Fällen aufgeklärt werden. 27 der 160 Patientinnenproben (16,9 %) blieben auch nach intensiver Folgeuntersuchung HPV-negativ. Hiervon hatte keine der Patientinnen mit zytologischer Reevaluation (24 Patientinnen) einen Pap-Abstrich > Pap IIIId. Sowohl die zytologischen Gutachten als auch die angewandten HPV-Testmethoden zeigten Differenzen innerhalb der Ergebnisse. Weitere Forschung ist notwendig, um die Screeninguntersuchungen zur Prävention des Zervixkarzinoms weiter zu verbessern.

Abstract

Background: Carcinoma of the cervix uteri has an incidence of 530,000 per year and is the second most common carcinoma in women worldwide. More than 270,000 die of it annually. Especially women in countries with no or less developed screening methods are at risk. An undisputable role in developing cervical dysplasia or carcinoma plays infection with the sexually transmitted high-risk(HR)-HPV-types. Therefore, one of the goals of cervical carcinoma prevention is to obviate HPV-infection and cervical dysplasia or respectively detection and treatment at an early stage.

This thesis deals with 160 patients tested negative for HPV-infection despite pathologic cytological or histological clinical evidence. By follow-up examinations of discrepant results of a genotyping test for human papillomaviruses discrepancy should be resolved.

Methods: Female patients with a Pap-smear of \geq Pap III and/or a CIN in spite of a negative HPV test were included. Out of 1,254 included samples 160 HPV-negative were screened again by the Multiplex HPV Genotyping Kit for Research (Multimetrix) in Epidemiology for a total of 24 HPV-types. 57 samples remained HPV-negative and were therefore sent to laboratories in Jena and Heidelberg. In Heidelberg, the samples were screened by a multiplexed analyzing system for 55 HPV-types and the viral load was estimated. In Jena, the samples were screened for the oncogene E7 for the seven most prevalent HR-HPV-types and also a GP-5+/6+-PCR-EIA was performed. The corresponding cytological/histological samples were subsequently sent to three independent experts for reevaluation of the cytological results.

Results: In 102 of 160 HPV-negative samples (63.75 %) Berlin found HPV with the Multimetrix-Kit, which were in conclusion defined as false-negative. One sample was excluded due to lack of material. HPV was found in 13 out of the 57 remaining negative samples in Jena. 44 remained negative. 28 samples were tested HPV-positive in Heidelberg, partly with rare HPV-types not included in the Multimetrix-Kit. 26 remained negative; three were also negative for β -Globin (human DNA) and thus excluded from the screen. All but two Pap-smears were down-graded by at least one expert.

Abstract

Conclusion: In most cases, discrepancy between positive cytology or histology and negative HPV results were resolved. 27 of 160 patients (16.9 %) remained HPV-negative. None of these, whose samples were referred to a cytological reevaluation, had a Pap-smear > Pap III. The cytological review as well as the HPV-testing methods showed some differences when comparing the results. Thus, further research is necessary to improve screening examinations for prevention of cervical cancer.

1 Einleitung

1.1 Humane Papillomviren

1.1.1 Klassifikation

Die Humanen Papillomviren (HPV) zählen zur Familie der Papillomaviridae. Sie umfassen insgesamt fünf Gattungen, wobei sie in 49 verschiedene Spezies aufgeteilt sind (1). Hierbei liegt in Bezug auf die Infektiosität beim Menschen ein besonderes Augenmerk auf der Gattung der α -Papillomviren, die mit der Entstehung von Tumoren von mukosalen Epithelien assoziiert werden, sowie auf der Gattung der β -Papillomviren, die mit kutanen Tumoren in Verbindung gebracht werden (2). Derzeit sind 198 unterschiedliche HPV-Typen bekannt, von denen jedoch nur ein Teil als karzinogen eingestuft wird (1; 3). Tabelle 1 zeigt die Einteilung einiger HPV bezüglich ihres Risikos für Zervixkarzinominduktion. In Tabelle 2 sind die durch sogenannte Hochrisiko(high-risk, HR)-HPV verursachten Tumore dargestellt. Die Niedrigrisiko(low-risk, LR)-HPV-Typen 6 und 11 verursachen mehr als 90 % aller Anogenitalwarzen, andere nicht maligne Läsionen und fast alle Fälle von rezidivierender respiratorischer Papillomatose (4). HR-HPV-Typen sind insbesondere für zervikale, jedoch auch für andere anogenitale und oropharyngeale Karzinome und Dysplasien verantwortlich (5; 6).

Tab. 1: Einteilung einiger HPV-Typen bezüglich ihrer Karzinogenität (7)

Unbestimmt	2a, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90, 91
LR-HPV	6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89, CP6108
Möglicherweise HR-HPV	26, 53, 66, 68, 73, 82
HR-HPV	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

Tab. 2: Beteiligung von HPV-Typen an unterschiedlichen Tumoren (modifiziert nach (8))

Tumorlokalisation		Meist beteiligte Papillomvirustypen	HPV-positive Fälle in %
Zervix		16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 (26, 68, 73, 82)	> 95
Vulva	Basal	16, 18	> 50
	Warzig	16, 18	> 50
	Keratinisierend	16	< 10
Vagina		16, 18	> 50
Anus		16, 18	> 70
Mundhöhle und Mandeln		16, 18, 33	< 20
Nagelbett		16	~ 75

1.1.2 Struktur und Aufbau

Papillomviren sind ikosaedrisch, unbehüllt, messen im Durchmesser etwa 50 - 60 nm und besitzen eine zirkuläre Doppelstrang-DNA mit einer Größe von etwa 8 kb, die von einem Kapsid umgeben ist. Das Genom ist in eine lange Kontrollregion (long control region, LCR) sowie eine frühe (early region) und eine späte Region (late region) unterteilt. Die lange Kontrollregion reguliert die virale Genexpression und die Replikation. Die Bezeichnung früh und spät bezieht sich in diesem Fall auf den Zeitpunkt im Leben des Virus, zu dem die Proteine erstmals exprimiert werden. Die frühe Region codiert für virale Nicht-Strukturproteine (E1, E2, E4-E7), welche für die virale Genexpression und Replikation verantwortlich sind. Durch den Funktionsverlust bestimmter Teile dieser Region wird das Virus unschädlich. Die späte Region codiert für virale Strukturproteine (L1, L2) (2). Das virale Strukturprotein L1 macht man sich zum einen bei der Klassifikation der HPV-Typen, zum anderen bei der Herstellung der Impfstoffe gegen HPV zunutze (3). Die Abbildung 1 zeigt das virale Genom anhand des Beispiels von HPV 16. Weitere Funktionen der viralen Proteine sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

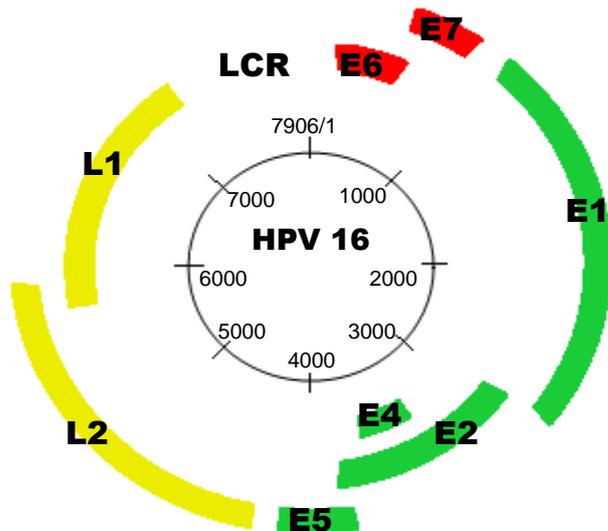


Abb. 1: HPV 16 als Beispiel der HPV-Genomstruktur (modifiziert nach (9)). LCR - long control region; E1, E2, E4-E7 - Nicht-Strukturproteine; L1, L2 - Strukturproteine; Zahlen am mittleren Kreis geben die Nukleotidposition an.

Tab. 3: Funktion von HPV-Proteinen (10)

Protein	Funktion
E1	ATPase und DNA-Helikase; nötig zur DNA-Replikation
E2	Regulation viraler Transkription; unterstützt E1 bei der Replikation
E4	Störung der Intermediärfilamente und des Zytoskeletts; erleichtert möglicherweise Aufbau und Freisetzung von Viren aus der Zelle
E5	Induziert unplanmäßige Zellproliferation; inhibiert Apoptose; behilflich bei Umgehung der Immunabwehr
E6	Induziert DNA-Synthese und aktiviert Telomerase; interagiert mit Zellproteinen (besonders p53) und greift damit negativ in DNA-Reparatur, Apoptose und Tumorsuppression ein
E7	Induziert spontane Zellproliferation; interagiert mit Regulatoren des Zellzyklus und Tumorsuppressoren (besonders pRb)
L1	Hauptstrukturprotein; bildet Kapsomere und Kapsid; interagiert mit Zellrezeptoren und L2
L2	Nebenstrukturprotein; vereinfacht Virionenaufnahme und -transport; interagiert mit viraler DNA

1.2 Zervixkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Weltweit stellt das Zervixkarzinom mit etwa 530.000 Neuerkrankungen pro Jahr die zweithäufigste Karzinomerkrankung bei Frauen dar. Mehr als 270.000 Frauen sterben weltweit jährlich am Zervixkarzinom, hiervon fallen etwa 85 % der Todesfälle auf Länder mit mittlerem und niedrigem Einkommensniveau (11). Die Inzidenzrate variiert daher je nach Herkunftsland zwischen 1 - 50 auf 100.000 Frauen, wobei die Raten in Lateinamerika, der Karibik, Subsahara-Afrika, Melanesien, Südost- und Südzentralasien

am höchsten sind (4). In Deutschland sind die Neuerkrankungen sowie die Sterberate seit 1980 stetig rückläufig. Im Jahr 2008 wurden ca. 4.900 Neuerkrankungen diagnostiziert und 1.600 Frauen verstarben am Zervixkarzinom. Vor 30 Jahren waren es noch etwa doppelt so viele. Eine große Rolle spielt dabei die Früherkennung und die rechtzeitige Behandlung von Krebsvorstufen. Das mittlere Erkrankungsalter für das *in situ* Karzinom beträgt in Deutschland 36 Jahre, wohingegen das bereits invasive Karzinom bei Frauen im Mittel mit 52 Jahren auftritt (12).

1.2.2 Ursachen

Die HPV-Infektion spielt bei der Entstehung des Zervixkarzinoms eine entscheidende und unumstrittene Rolle. Sie erfolgt hauptsächlich über Geschlechtsverkehr und ist hoch ansteckend. Das Infektionsrisiko für Frauen, sich mindestens einmal in ihrem Leben mit HPV zu infizieren, beträgt mindestens 75 % (13). Innerhalb der ersten zwei Jahre heilen bis zu 90 % der Infektionen spontan aus (11). Liegt bereits eine CIN I (Zervikale intraepitheliale Neoplasie, Grad 1) vor, so ist in ca. 55 % der Fälle mit einer Spontanremission zu rechnen. Bei der CIN II beträgt die Remissionsrate noch etwa 40 %, allerdings beträgt die Progressionswahrscheinlichkeit zum invasiven Karzinom schon bis zu 30 % (14). In etwa 10 % der Fälle einer Infektion mit einem HR-HPV kommt es zur Persistenz. Von den persistierenden 10 % der Infektionen verursachen wiederum 10 - 50 % im Laufe von zwei bis zehn Jahren eine CIN III, die als obligate Präkanzerose gilt. Je nachdem über welchen Zeitraum die Patientinnen beobachtet wurden, wird die Progressionsrate einer CIN III zum invasiven Plattenepithelkarzinom in unterschiedlichen Studien zwischen 12 und 70 % angegeben (15). Bei einem Follow-up von mehr als 10 Jahren sogar mit bis zu 74 %. Es müssen keinesfalls alle CIN-Stadien durchlaufen werden. Es kann auch vorkommen, dass sich direkt eine mittel- oder schwergradige Dysplasie ausbildet (14). Vom Zeitpunkt der initialen HPV-Infektion bis zur Entwicklung des Zervixkarzinoms vergehen im Schnitt etwa 20 Jahre (4). Die HR-HPV-Typen 16 und 18 sind hierbei in 70 % der Karzinome nachweisbar, etwa 50 % davon fallen auf den HR-HPV-Typ 16. Schließt man die HR-HPV-Typen 31, 33 und 45 mit ein, sind es 80 %. Insgesamt lassen sich in 99,7 % der Plattenepithelkarzinome HR-HPV-Typen nachweisen (8; 15). Nicht nur der HPV-Typ, sondern auch die Viruslast sind von prognostischer Bedeutung (16).

Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom liegt beim Adenokarzinom nur in ca. 71 % der Fälle eine HPV-Infektion vor. Mit Angaben von 52 - 56 % ist hier der HR-HPV-Typ 18 am häufigsten, gefolgt vom HR-HPV-Typ 16 mit 28 - 33 % (17; 18). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich hierbei im Alter der Patientinnen. Während man bei Patientinnen unter 40 Jahren noch in 89 % der Fälle HR-HPV-Typen nachweisen konnte, waren es bei den über 60-jährigen nur noch 43 % (17).

Neben der HPV-Infektion gibt es weitere Risikofaktoren, die die Entstehung eines Zervixkarzinoms begünstigen. Hierzu zählen frühzeitiger erstmaliger Geschlechtsverkehr, Multiparität, Promiskuität, Tabakrauchen, schlechter Ernährungszustand und Immunsuppression (z. B. bei Erkrankung mit HIV) sowie andere sexuell übertragbare Krankheiten (11; 12; 19). Sowohl für Raucher als auch für ehemalige Raucher gilt das Tabakrauchen als Risikofaktor für das Plattenepithelkarzinom. Hierbei ist das Risiko umso höher, je früher mit dem Rauchen begonnen und je mehr Zigaretten pro Tag geraucht wurden. Das Risiko ein Adenokarzinom zu entwickeln, ist durch das Rauchen nicht erhöht (20). Eine genetische Disposition wurde durch Zwillingsstudien und Studien mit Verwandten ersten Grades nachgewiesen. Demnach haben Frauen, deren Verwandte ersten Grades an einem Zervixkarzinom leiden, ein zweifach erhöhtes Risiko gegenüber Frauen ohne dieses familiäre Leiden. Ein Zusammenhang zwischen oralen Kontrazeptiva und der Entstehung des Zervixkarzinoms wird angenommen (12; 19).

1.2.3 Entstehung und Verlauf

Das häufigste Karzinom der Zervix ist das Plattenepithelkarzinom mit ca. 75 %, gefolgt vom Adenokarzinom mit ca. 20 %. Das kleinzellig-neuroendokrine Karzinom macht weniger als 5 % der Zervixkarzinome aus, es gleicht dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (21). Einen weiteren geringen Anteil bilden unter anderem großzellig-neuroendokrine, klarzellige sowie serös-papilläre Karzinome (22).

Aus Gründen der Häufigkeit wird im Folgenden hauptsächlich auf das Plattenepithelkarzinom der Zervix eingegangen.

Das Plattenepithelkarzinom entsteht in der sogenannten Transformationszone. Diese stellt den Übergang zwischen originärem Plattenepithel und Zylinderepithel dar und

befindet sich anfangs auf der Ektozervix. Das ektozervikal liegende Zylinderepithel wird im Laufe der Jahre durch Plattenepithel ersetzt, wodurch sich die Transformationszone nach endozervikal verschiebt. Dies kann in Form der indirekten Metaplasie geschehen. Sie erfolgt in mehreren Stufen.

Zunächst differenzieren Reservezellen, welche sich im Stroma unterhalb der Zylinderepithelzellen nahe der Transformationszone befinden, zu metaplastischen Epithelzellen aus. Man spricht hierbei von unreifer Metaplasie. Sie wird durch die reife Metaplasie ersetzt, indem sich die metaplastischen Zellen zu Plattenepithelzellen ausdifferenzieren. Das sekundär originäre Plattenepithel geht demnach aus der reifen Metaplasie hervor und ist morphologisch nicht vom primär originären Plattenepithel zu unterscheiden. Eine weitere Möglichkeit ist ein zungenartiges Wachstum des Plattenepithels über das Zylinderepithel (23).

Für den Lebenszyklus der HPV ist eine Infektion der basalen Zellschicht notwendig, da sich hier langlebigere Zellen mit z. T. stammzellähnlichen Eigenschaften befinden. Durch Mikrotraumen innerhalb der oberen Zellschichten kann das HPV zu den basal liegenden Zellen gelangen. Nach dem Eindringen verbleibt das virale Genom in den Basalzellen in episomaler Form. Das Virus umgeht lange eine Immunantwort, indem es die virale Genexpression und Replikation weitestgehend auf die suprabasalen Zellschichten limitiert. Mit Ausdifferenzierung der Zellen gelangen diese weiter nach suprabasal, die Virusreplikation nimmt zu und beeinflusst die Ausdifferenzierung. Dadurch entstehen morphologische Veränderungen des Epithels wie Papillomatose, Parakeratose und Koilozytose (13). Diese Epithelveränderungen werden je nach Ausmaß den zervikalen intraepithelialen Neoplasien zugeteilt und können im Verlauf zum Zervixkarzinom führen. Schwergradige Dysplasien sind in Deutschland um das 50- bis 100-fache höher als das Auftreten eines Zervixkarzinoms. Die Inzidenz der schweren Dysplasie liegt in etwa bei 1 % (15). Die Abbildung 2 zeigt den Verlauf vom normalen zervikalen Epithel zum invasiven Zervixkarzinom.

Einleitung

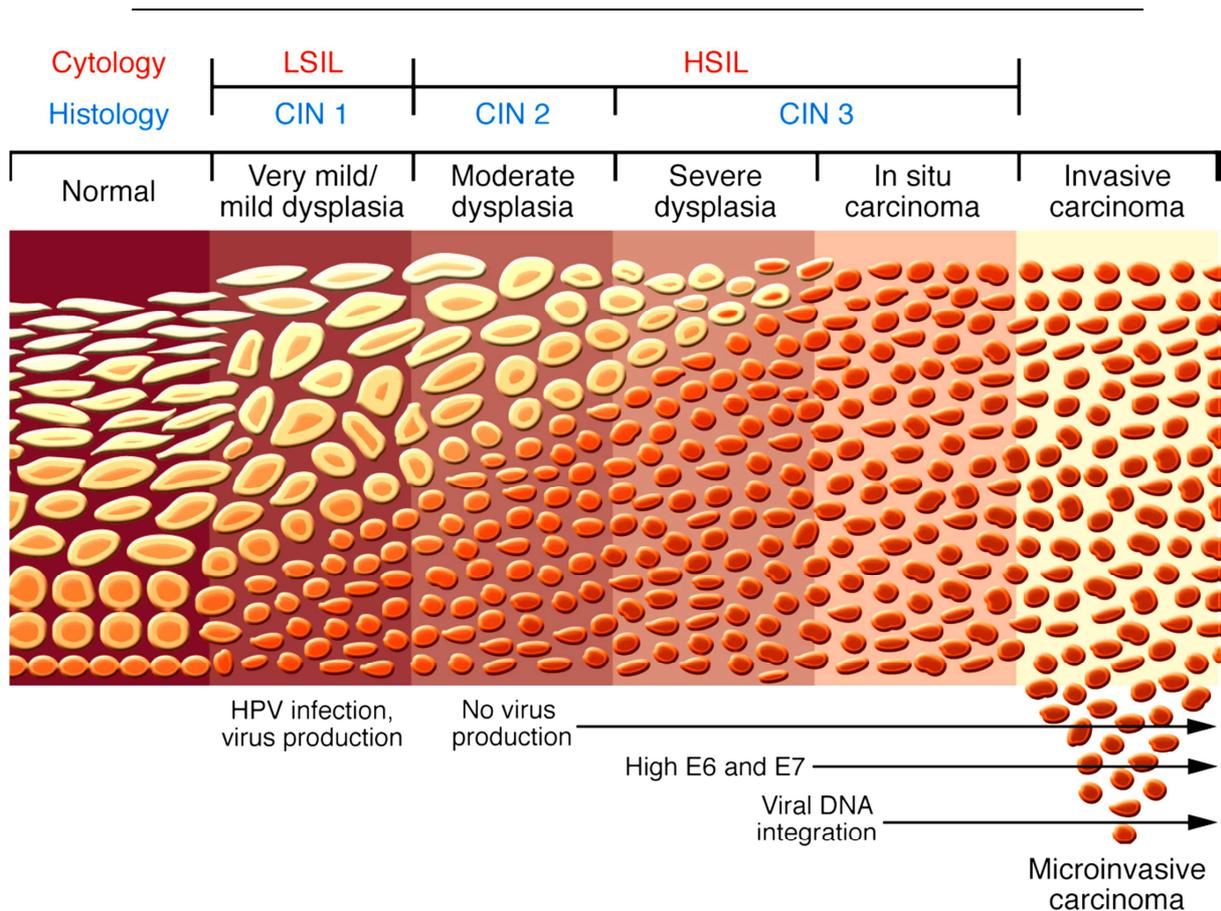


Abb. 2: Verlauf vom normalen Zervixepithel bis zum invasiven Zervixkarzinom nach HPV-Infektion. Infizierte Zellen gelangen während der Ausdifferenzierung von basal weiter in suprabasale Schichten, bis beim invasiven Karzinom keine Schichtung mehr zu erkennen und die Basalmembran durchbrochen ist. HPV - Humane Papillomviren; LSIL - low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL - high-grade intraepithelial lesion; CIN - zervikale intraepitheliale Neoplasie; E6 und E7 - virale Onkoproteine (aus (13)).

1.2.4 Nomenklatur

Die Läsionen des Plattenepithels werden histologisch nach der 2. WHO-Nomenklatur in zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN) eingeteilt. Die zytologische Einteilung erfolgt in Deutschland zum Zeitpunkt der Datenauswertung hauptsächlich nach der 2. Münchner Nomenklatur (Pap), aber auch das Bethesda System, wonach squamöse intraepitheliale Läsionen (SIL) unterteilt werden, wird hierfür genutzt. Die Tabelle 4 zeigt die beiden unterschiedlichen Nomenklaturen im Vergleich. Die 3. Münchener Nomenklatur erschien erst nach Klassifizierung und Auswertung der Befunde dieser Arbeit und ist daher für die aktuelle Arbeit nicht angewandt worden.

Tab. 4: Zytologische Einteilung nach 2. Münchner Nomenklatur und Bethesda-System, histologische Einteilung nach 2. WHO-Nomenklatur im Vergleich (modifiziert nach (8))

2. Münchner Nomenklatur (Pap)		2. WHO Nomenklatur; zervikale intraepitheliale Neoplasie	Bethesda-System; squamöse intraepitheliale Läsion
I	normales Zellbild		
II^{a)}	leichte entzündliche, degenerative oder metaplastische Veränderungen		
III	unklarer Befund: schwere entzündliche oder degenerative Veränderungen, auffällige Drüsenzellen; eine Dysplasie, ein Carcinoma in situ oder (in seltenen Fällen) ein Malignom können nicht ausgeschlossen werden		ASC-US: atypical squamous cells of undetermined significance ASC-H: atypical squamous cells – cannot exclude HSIL
III^d	leichte bzw. mäßige Dysplasie	CIN I: leichte oder geringgradige Dysplasie; Atypien auf basales Epitheldrittel beschränkt	LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion
		CIN II: mittelschwere oder mäßiggradige Dysplasie; Atypien auf basales und mittleres Epitheldrittel beschränkt	HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion
IV^a	schwere Dysplasie oder Carcinoma in situ	CIN III: schwere oder hochgradige Dysplasie, inkl. Carcinoma in situ; Atypien erfassen oberflächliches Epitheldrittel	
IV^b	schwere Dysplasie oder Carcinoma in situ, invasives Karzinom nicht auszuschließen		
V	invasives Karzinom		

a) Pap II wird z. T. noch mit den Suffixen „k“ oder „w“ angegeben, diese stehen für k = Kontrolle oder w = Wiederholung. Sie werden bei unzureichendem Abstrichmaterial, aber auch bei nicht eindeutig als abnorm oder normal einzustufenden Zellen benutzt. Der Abstrich soll hier zeitnah wiederholt werden (aus (24)).

1.2.5 Symptome

Die HPV-Infektion sowie das Zervixkarzinom verursachen in der Regel keine bzw. erst im fortgeschrittenen Stadium Symptome und bleiben ohne Vorsorgeuntersuchung daher lange unentdeckt. Symptome umfassen: irreguläre, intermenstruelle Blutungen bzw. Kontaktblutungen nach dem Koitus; Rücken-, Bein- oder Beckenschmerzen; Müdigkeit, Gewichtsverlust, Appetitverlust; vaginales Unbehagen, Fluor, Odor oder auch

Schwellung eines Beines. Des Weiteren können Begleitentzündungen durch andere Erreger hervorgerufen werden (11; 25).

Das invasive Zervixkarzinom ist im frühen Stadium weder klinisch noch kolposkopisch leicht sichtbar. Es wird jedoch mit zunehmender Größe als Exophyt auf der Portio uteri erkennbar bzw. palpatorisch auffällig. Lymphknotenmetastasen treten bei einer Infiltrationstiefe des Tumors von weniger als 3 mm in 1 % der Fälle auf. Liegt die Infiltrationstiefe jedoch über 5 mm, so steigt die Lymphknotenmetastasierungsrate auf über 10 %. Durch die Invasion von Tumorzellen in das umliegende parametranne Weichteilgewebe kann dieses die Beckenorgane fixieren, was auch als „frozen pelvis“ bezeichnet wird. Fernmetastasen und Infiltration angrenzender Strukturen, wie Becken oder Rektum, treten erst spät im Verlauf auf (21).

1.2.6 Diagnostik

1.2.6.1 Zytologie

In Deutschland können Frauen ab dem 20. Lebensjahr im Rahmen der Krebsvorsorgeuntersuchung einmal jährlich einen Papanicolaou-Abstrich-Test (Pap-Test) durchführen lassen. In anderen Ländern Europas betragen die Intervalle zwischen den Pap-Tests ein bis fünf, häufig drei Jahre. Beim Pap-Test wird mit Hilfe eines Wattestäbchens, einer kleinen Bürste oder eines Holzspatels ein Abstrich vom Muttermund und dem Gebärmutterhalskanal entnommen und auf einem Objektträger fixiert. Durch eine spezielle Färbung lassen sich die entnommenen Zellen im Anschluss begutachten. Eine Einteilung der Ergebnisse erfolgt nach der 2. Münchner Nomenklatur (26).

Alternativ wird die Möglichkeit zur Durchführung einer flüssigkeitsbasierten Dünnschichtzytologie (z. B. ThinPrep, PapSpin, SurePath) diskutiert. Hierbei werden die Zellen nach Entnahme des Abstrichs nicht auf einem Objektträger fixiert, sondern in einer patentierten Lösung konserviert. Im Anschluss wird die Probe von Verunreinigungen wie Blut, Schleim und Entzündungszellen gereinigt. Die zu untersuchenden Zellen werden dann einschichtig auf einem Objektträger platziert, was eine bessere Beurteilung des Abstrichpräparates erlauben soll. Nachteile der Methodik sind unter anderem der Verlust von zur Beurteilung relevantem extrazellulärem Material

und die höheren Kosten (27). Gleichzeitig konnte eine Überlegenheit der Methode gegenüber dem konventionellen Pap-Test in unterschiedlichen Studien bisher nicht erwiesen werden (22).

In Deutschland nimmt nur jede zweite Frau ihre jährliche Screening-Möglichkeit in Anspruch. Durch sie können höhergradige Dysplasien und Präkanzerosen rechtzeitig entdeckt und behandelt werden. Dies kann bis zu 80 % der Zervixkarzinome in Ländern mit Vorsorgescreening verhindern (11). Unterschiedliche Studien geben eine Mortalitätssenkung nach der Einführung der Screeningmethoden von 40 - 90 % an (26). Die Diagnose eines bereits invasiven Karzinoms erfolgt in etwa 50 % der Fälle in Deutschland noch im frühen Tumorstadium (T1) und ist somit gut zu behandeln (12).

1.2.6.2 Kolposkopie

Die Kolposkopie wird derzeit nicht zum Screening eingesetzt, ist jedoch der Goldstandard zur Abklärung abnormer zytologischer Befunde. Bei der Kolposkopie wird der Gebärmutterhals durch eine 6 - 40-fache Vergrößerung begutachtet. Zusätzlich können krankhaft veränderte Zellen durch das betupfen der Zervixschleimhaut mit 3- oder 5%iger Essigsäure besser sichtbar gemacht werden. Essigsäure färbt atypisches Epithel, aber auch normales Zylinderepithel und metaplastisches Epithel weiß. Des Weiteren können Zellen mit 3%iger Jodlösung, der sogenannten Schiller'schen Jodprobe, angefärbt werden. Jod färbt glykogenspeichernde Zellen wie normales nicht verhornendes Plattenepithel dunkelbraun (Jod-positiv). Atypisches Epithel, normales Zylinderepithel und metaplastisches Epithel färbt es hingegen gelb oder gar nicht (Jod-negativ). Die Färbungen ermöglichen eine gezielte Biopsie und eine anschließende histologische Beurteilung der Läsionen gemäß der 2. WHO-Nomenklatur. Die bei der Kolposkopie sichtbaren Läsionen werden anhand der Kriterien Farbe, Oberflächenbeschaffenheit, Gefäßabstand, Abgrenzung und Jodanfärbung in unterschiedliche Schweregrade eingestuft (22; 28).

1.2.6.3 HPV-Diagnostik

Unterschiedliche Verfahren stehen derzeit zur Detektion von HPV zur Verfügung. Der direkte Nachweis erfolgt durch Southern Blot oder in-situ-Hybridisierung. Diese Verfahren sind jedoch nicht so sensitiv, mit viel Arbeitsaufwand verbunden und somit ungünstig für eine hohe Anzahl von Probandendurchläufen wie beim Screening.

Signalverstärkung wird beim Hybrid Capture II System (HC2) angewandt. Die Ziel HPV-DNA wird mit markierten RNA-Proben in Lösung hybridisiert. Daraus resultierende RNA-DNA-Hybride werden auf Mikrotiterplatten durch Antikörper mit Spezifität für RNA-DNA-Hybride gebunden und durch ebensolche spezifische Antikörper und ein chemolumineszentes Substrat detektiert. Die Schwäche dieses Tests besteht darin, dass nur eine Aussage über das Vorhandensein von HR- oder LR-HPV getroffen werden kann, jedoch keine Identifizierung der einzelnen HPV-Typen möglich ist (29).

Eine weitere auch in dieser Arbeit angewandte Methode ist die gezielte Amplifikation gesuchter viraler DNA-Abschnitte. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist die am häufigsten verwendete Methode, um virale DNA-Abschnitte gezielt zu vervielfältigen. Hierbei können unterschiedliche Primer genutzt werden. Bestimmte Primer mit breitem Spektrum zielen auf die Amplifikation eines Genabschnitts vieler HPV-Typen ab, zum Beispiel L1 oder E1. Zur Typisierung ist im Anschluss an die PCR ein weiterer Schritt mit radioaktiven oder biotinylierten Oligonukleotiden notwendig. Zu den Primer-Sets zählen unter anderem PGMY09/10, MY09/11 (MY-PCR), GP-5+/6+ (GP+-PCR) und SPF10. Die Primer besitzen jeweils andere Temperaturoptima, amplifizieren unterschiedliche Regionen und produzieren verschieden lange Genprodukte, wodurch sie sich in ihrer Sensitivität und Spezifität unterscheiden. Während man die GP+-PCR in Europa bevorzugt, macht man sich in den USA und Asien meistens die MY-PCR zunutze. Des Weiteren gibt es Primer, die ausschließlich auf einen spezifischen Genabschnitt eines bestimmten HPV-Typen abzielen, bspw. E6/E7. Der Vorteil besteht darin, dass auch HPV in Zellen detektiert werden kann, in denen das virale Genom nicht mehr in episomaler, sondern in integrierter Form vorliegt, in der die Abschnitte E1 und E2 aber auch L1 und L2 verloren gegangen sein können (30; 31).

Der HPV-Nachweis wird zwar derzeit im Screening nicht routinemäßig angeboten, kann jedoch eine entscheidende Rolle in der Diagnostik und weiteren Therapie haben. Die Detektion von HPV stellt eine sensitivere Test-Methode als der Pap-Abstrich dar, wodurch Dysplasien in einem früheren Stadium entdeckt und behandelt werden können. Dies kann jedoch auch zur Übertherapie führen, da HPV-Infektionen oft vom Immunsystem beseitigt werden und Läsionen sich häufig von alleine zurückbilden. Über den therapeutischen und wirtschaftlichen Nutzen eines alleinigen HPV-Screenings oder des kombinierten HPV- und Pap-Test-Screenings wird daher diskutiert (32; 33; 34). Da

persistierende HPV-Infektionen über längere Zeit zu Präkanzerosen und Karzinomen führen können, sollte bei einer persistierenden HPV-Infektion deren Eradikation im Vordergrund stehen.

1.2.7 Therapie und Heilungschancen

Beim Verdacht auf eine Dysplasie sollte eine Behandlung durchgeführt werden und eine anschließende Kontrolluntersuchung stattfinden, um die Zellen im Anschluss besser beurteilen zu können. Sollten sich Zellveränderungen auch nach Abschluss der Behandlung zeigen bzw. Dysplasien längerfristig bestehen bleiben, werden eine kolposkopische Untersuchung sowie eine Biopsie notwendig. Diese erfolgt je nach Läsion als Knipsbiopsie oder durch eine Konisation. Aufgrund der Rückbildungstendenz von CIN I und CIN II sollte eine Konisation nur bei CIN III erfolgen. Besteht jedoch eine Befundpersistenz über zwölf Monate bzw. HR-HPV-Infektionspersistenz, kann in Abhängigkeit von Alter und Kinderwunsch auf Wunsch der Patientin eine Konisation auch bei einem CIN I oder CIN II Befund durchgeführt werden. Die Konisation wird entweder als Schlingenkonisation oder Laserkonisation bzw. bei ektozervikal gelegenen Läsionen auch per Laservaporisation ausgeführt. Die Konisation mittels Skalpell zeigt eine schlechtere Heilungstendenz. Eine Kürettage der verbleibenden Endozervix kann zum Ausschluss weiterer Neoplasien erforderlich sein. Wird bei der anschließenden histologischen Untersuchung sichergestellt, dass der dysplastische Zellverband im Gesunden entfernt wurde und keine malignen Zellen aufweist, so stellt diese diagnostische Maßnahme gleichzeitig die Therapie dar (22). Tabelle 5 gibt Empfehlungen zum Vorgehen nach stattgehabter zytologischer Untersuchung und HPV-Testung wieder.

Tab. 5: Empfehlungen zur weiteren Diagnostik abhängig vom zytologischen und vom HPV-Befund (8)

Zytologischer Befund	HPV-Befund	Zytologische Kontrolle	Weitere Diagnostik
Pap I / II	HR-negativ	Routineintervall	
	HR-positiv	12 Monate	Gleichzeitig HPV-Kontrolle. Falls wieder HR-positiv oder zytologisch auffällig: Dysplasiesprechstunde ^{a)}
Pap II w	HR-negativ	12 Monate	+ erneute HPV-Testung
	HR-positiv	6 Monate	Gleichzeitig HPV-Kontrolle. Falls wieder HR-positiv oder zytologisch auffällig: Dysplasiesprechstunde ^{a)}
Pap III^{b)} / III d erstmalig	HR-negativ	6 Monate	+ erneute HPV-Testung
	HR-positiv	3 - 6 Monate	Falls erneut HPV-positiv: Dysplasiesprechstunde ^{a)}
Pap III^{b)} / III d wiederholt	HR-negativ	6 Monate	+ erneute HPV-Testung. In jedem Fall Dysplasiesprechstunde ^{a)} nach 12 Monaten
	HR-positiv		Dysplasiesprechstunde ^{a)}
Pap IVa oder höher	unabhängig		Dysplasiesprechstunde ^{a)}

a) Dysplasiesprechstunde = Differentialkolposkopie mit Biopsie eventueller Herdbefunde.

b) Bei Pap III mit dringlichem V. a. höhergradige Atypie in jedem Fall rasche diagnostische Abklärung.

Pap = Pap-Abstrich Befund nach 2. Münchner Nomenklatur; HR = high-risk.

1.2.7.1 Stadieneinteilung

Sollten sich bei der Biopsie bzw. Konisation maligne Zellen zeigen, erfolgt die weitere Klassifikation des Zervixkarzinoms gemäß der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) bzw. der International Union against Cancer (UICC), dargestellt in Tabelle 6. Während die FIGO-Klassifikation eine klinisch-diagnostische Stadieneinteilung umfasst, beruht die UICC-Klassifikation auf histopathologisch gesicherten Daten. Zur klinisch-diagnostischen Stadieneinteilung können folgende weiterführende Untersuchungen je nach vermuteter Tumorausbreitung notwendig sein: Röntgen-Thorax; transvaginaler Ultraschall, Sonographie der Nieren und der Leber, Sonographie der Skalenusregion zur Detektion von Lymphknotenmetastasen; ggf. Zystoskopie und Rektoskopie; bei endozervikalem Prozess eine Kürettage des Uterus sowie eventuell eine Hysteroskopie; MRT zur weiteren Einschätzung der Tumorgöße; Positronenemissionstomographie; Biopsien suspekter Lymphknoten; Laparoskopie zum operativen Staging; Bestimmung von Tumormarkern zur Verlaufskontrolle: SCC bei Plattenepithelkarzinom, CEA bzw. CA 125 bei Adenokarzinomen und NSE bei neuroendokrinen Karzinomen (35).

Tab. 6: Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms (22)

UICC	FIGO	Definition
T0, Tis	0	Carcinoma in situ
	I	Karzinom auf Zervix beschränkt
T1a N0 M0	IA	Präklinisches, nur mikroskopisch nachweisbares Karzinom
T1a1 N0 M0	IA1	Invasionstiefe bis 3 mm; Oberflächenausdehnung ≤ 7 mm
T1a2 N0 M0	IA2	Invasionstiefe 3 – 5 mm; Oberflächenausdehnung ≤ 7 mm
T1b N0 M0	IB	Klinisch sichtbar / nur mikroskopisch diagnostiziert und > T1a2
T1b1 N0 M0	IB1	≤ 4 cm
T1b2 N0 M0	IB2	> 4 cm
	II	Ausbreitung über Zervix hinaus, ohne die Beckenwand bzw. das untere Vaginadrittel zu erreichen
T2a N0 M0	IIA	Parametrien frei
T2b N0 M0	IIB	Parametrien befallen
	III	Karzinom erreicht die Beckenwand / unteres Vaginadrittel / Hydroureter
T3a N0 M0	IIIA	Karzinom erreicht das untere Vaginadrittel
T1, T2a, T3a N1 M0 T3b Nx M0	IIIB	Karzinom erreicht die Beckenwand und/oder Hydroureter
T4 Nx M0	IVA	Schleimhautinfiltration von Harnblase oder Rektum und/oder Ausbreitung außerhalb des Beckens
Tx Nx M1	IVB	Fernmetastasen

FIGO = Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique; UICC = International Union against Cancer;

T = Tumorgroße / -ausbreitung; N = Lymphknotenstatus; M = Fernmetastasen.

1.2.7.2 Prognose

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt nach der Diagnose eines invasiven Zervixkarzinoms in Deutschland durchschnittlich bei 68 % (12). Die Überlebensraten von 15.070 Patientinnen aus den USA werden in Abhängigkeit vom FIGO Stadium in Tabelle 7 wiedergegeben. Unterschiedliche Faktoren nehmen hierbei Einfluss auf die Prognose. Zu den wichtigsten Faktoren zählen der Lymphknotenstatus, Tumorgroße, Parametriumausdehnung, Invasionstiefe, Alter der Patientin und Einbruch von Tumorzellen in Blut- oder Lymphgefäße (28). Ein netzartig infiltrierend wachsender Tumor und Tumore mit fehlender peritumorale entzündlicher Reaktion scheinen eine ungünstigere Prognose zu haben, die Datenlage hierzu ist jedoch noch nicht ausreichend (35). Jüngere Patientinnen haben bei fortgeschrittenen Tumoren laut mehreren Studien ein prognostisch schlechteres Ergebnis. Patientinnen mit negativen Lymphknoten haben unabhängig vom Tumorstadium eine 5-Jahres-Überlebensrate von 90 %, bei positivem Befall nur zwischen 20 - 60 %. Dabei korreliert die Anzahl der

befallenen Lymphknoten direkt mit dem Rezidivrisiko. Beim Befall von Blutgefäßen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur bei 30 %. Ein schlecht differenzierter Tumor tendiert häufiger zu Rezidiven unabhängig von der Tumorgroße. Auch die zervikale Stromainvasion ist unabhängig mit dem rezidivfreien Überleben assoziiert (28).

Tab. 7: Überlebensrate in Abhängigkeit vom FIGO Stadium (modifiziert nach (36))

FIGO	Patientinnenanzahl	Überlebensrate in Prozent nach Jahren				
		1	2	3	4	5
	insgesamt 15.070					
0	7.119	99,1	97,8	96,8	94,9	92,8
IA	1.530	98,9	97,5	96,6	94,6	93,2
IB	2.249	96,8	91,4	87,1	83,0	80,3
IIA	453	92,2	79,3	72,0	66,1	63,2
IIB	1.518	90,3	77,1	68,1	62,2	58,0
IIIA	191	81,6	54,9	45,3	38,9	35,4
IIIB	1.009	72,0	48,4	39,2	35,7	32,4
IVA	213	55,3	35,3	25,0	19,1	16,1
IVB	788	43,3	26,2	19,2	16,9	14,6

Die Statistik bezieht sich auf 15.070 Patientinnen mit Zervixkarzinom, diagnostiziert im Zeitraum von 2000 - 2002. Die Daten stammen aus dem „National Cancer Data Base (Commission on Cancer of the American College of Surgeons and the American Cancer Society)“; FIGO = Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique.

1.2.7.3 Therapie

Die Entscheidung über Therapiemaßnahmen erfolgt interdisziplinär. Hierbei ist individuell eine Risiko-Nutzen Abwägung unter Berücksichtigung von Kurz- und Langzeitfolgen der einzelnen Therapiemaßnahmen und der Lebenssituation sowie des Gesundheitszustands der Patientin vorzunehmen. Grundsätzlich wird in den frühen Stadien, insbesondere bei prämenopausalen Frauen, die Operation empfohlen. Dabei kann im Stadium FIGO IA1 die Konisation ausreichen, bei Befall pelviner Lymphknoten müssen diese entfernt werden. Bei höheren Stadien (FIGO IA2 - IIB) wird eine radikale Hysterektomie mit Entfernung der pelvinen, stadienabhängig ggf. der paraaortalen Lymphknoten notwendig. Eine simultane Radiochemotherapie führt in den Stadien IB und II bei unterschiedlichen Nebenwirkungsprofilen und Rezidivmustern zu prinzipiell gleichwertigen Langzeitergebnissen. Im Stadium III besteht die Indikation zur simultanen Radiochemotherapie. Im Stadium IV kann eine palliative, gelegentlich auch kurative Radiotherapie durchgeführt werden. Bei Blasen- oder Rektuminfiltration kann eine primäre Exenteration erfolgen, sofern die Beckenwand tumorfrei ist, dies ist jedoch

individuell mit der Patientin zu entscheiden. Die Chemotherapie kann neoadjuvant zur Verbesserung der Operabilität durchgeführt werden, hat adjuvant jedoch bisher keinen klinischen Vorteil erwiesen. Vorteil und Toxizität einer palliativen Chemotherapie sind abzuwägen. Das mediane Überleben nach stattgehabter Chemotherapie liegt hierbei unter einem Jahr (35). Supportive Maßnahmen und Anschlussheilbehandlungen sollten interdisziplinär eingeleitet werden.

1.2.8 Prävention

Zur primären Prävention wird seit 2007 durch die STIKO für Mädchen zwischen 12 und 17 Jahren die Impfung gegen die zwei häufigsten HR-HPV-Typen 16 und 18 empfohlen. Diese sind für etwa 70 % aller Zervixkarzinome verantwortlich (12). In einigen Ländern wird die Impfung im Alter von 10 - 14 Jahren empfohlen (4). Der Impfstoff wird durch eine rekombinante DNA-Technik gewonnen, wobei man aus dem Hauptstrukturprotein L1 virusähnliche Partikel, welche keine Virus-DNA mehr enthalten, herstellt (37). Derzeit sind der bivalente Impfstoff Cervarix[®] gegen die HPV-Typen 16 sowie 18 und der quadrivalente Impfstoff Gardasil[®], der zusätzlich noch gegen die LR-HPV-Typen 6 und 11 immunisiert, zugelassen. Die Impfstoffe sind ausschließlich zur Prophylaxe, jedoch weder zur Eradikation bestehender HPV-Infektionen noch zur Heilung HPV-assoziiertes Krankheiten bestimmt. Geimpft wird in drei Dosen innerhalb von sechs Monaten. Der Abstand zwischen den Impfungen variiert je nach verwendetem Impfstoff. Bisherige Studien ergaben eine hohe Effektivität in der Prävention präkanzeröser Läsionen. Aufgrund der jungen Datenlage stehen Langzeitstudienresultate derzeit noch aus (4).

Sexuelle Aufklärung, insbesondere zur Übertragung und zum Schutz vor sexuell übertragbaren Krankheiten, bildet eine weitere Grundlage der primären Prävention. Kondome vermindern das Übertragungsrisiko einer HPV-Infektion, stellen jedoch keinen absoluten Schutz dar. CIN I und CIN II tendieren bei der Nutzung von Kondomen jedoch eher zur Regression (8). Die Beschneidung des Mannes soll helfen vor HPV-Infektionen zu schützen (11).

Zur sekundären Prävention zählen die weiter oben bereits beschriebenen Früherkennungsmaßnahmen. Als Beispiele sind die kolposkopische Inspektion, der Pap-Abstrich sowie der HPV-Nachweis zu nennen. Da die Screeninguntersuchungen in Entwicklungsländern kaum eine Rolle spielen, dort jedoch mehr als 80 % der

Zervixkarzinome weltweit auftreten, sollten das Angebot und der Zugang zu Früherkennungsmaßnahmen unbedingt gesteigert werden. Ein Ansatz in dieser Hinsicht sind Screeninguntersuchungen, die bloß einmalig etwa im Alter von 35 Jahren durchgeführt werden. Hier treten im Durchschnitt die häufigsten Präkanzerosen und frühen Tumorstadien auf, sind zu dem Zeitpunkt aber meist noch gut zu behandeln. Diese Untersuchung kann mit einem HPV-Test kombiniert werden, bei dem die Viruslast und der HPV-Typ in die Risikoermittlung einbezogen werden. Frauen mit präkanzerösen Läsionen bzw. erhöhtem Karzinomrisiko könnten dann bei einem weiteren Termin behandelt werden. Solche Früherkennungsmaßnahmen und Behandlungsansätze müssen in den jeweiligen Ländern jedoch nicht nur bezahlbar und lokal durchführbar sein, sondern insbesondere Akzeptanz genießen (16).

2 Herleitung der Fragestellung

Aktuellen Studien zufolge liegt eine HPV-Infektion bei bis zu 99,7 % der Patientinnen mit Zervixkarzinom vor (8). Je nach Kontinent ergeben andere Studien eine HR-HPV-Prävalenz von 86 - 94 % für invasive zervikale Karzinome und 78 - 88 % für HSIL. In den meisten Ländern sind die HR-HPV-Typen in Zervixkarzinomen gemäß nachstehender Reihenfolge mit abnehmender Häufigkeit nachweisbar: HPV 16 (ca. 52 - 58 %), 18 (13 - 22 %), 31, 33, 35, 45, 52 und 58 (38). Nicht nur in Karzinomen und fortgeschrittenen Läsionen lassen sich HR-HPV nachweisen. Eine Metaanalyse von insgesamt 55 Studien und 8.308 LSIL Fällen ergab, dass auch in den leichteren Dysplasien HPV je nach Region in 59 - 80 % der Fälle nachgewiesen werden konnte. Hierbei handelte es sich in abnehmender Häufigkeit um folgende HPV-Typen: HPV 16, 31, 51, 53, 56, 52, 18, 66, 58, 6, 39, 33, 59, 35, 45 (39). Die HR-HPV-Typen 16 oder 18 können in etwa einem Drittel der leichten Dysplasien (CIN I) und bereits in der Hälfte höhergradiger Dysplasien (CIN II+) nachgewiesen werden (15).

Eine starke Assoziation von HR-HPV-Infektion und dem Zervixkarzinom bzw. dessen Vorstufen ist also gegeben. Daher befasst sich diese Arbeit mit den Daten von Patientinnen, die bei pathologischem zytologischen und/oder histologischen Befund trotzdem einen negativen HPV-Test aufwiesen. Eine solche Diskrepanz ist von Wichtigkeit insbesondere in Bezug auf die sekundäre Prävention. Der Diskrepanz können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. Beispielsweise kann es bei der Integration der viralen DNA in die Wirts-DNA zum Verlust bestimmter Genabschnitte (z. B. L1) gekommen sein, wodurch einige Tests diese Abschnitte nicht mehr nachweisen können. Die Testmethoden selbst könnten nicht sensitiv genug sein. Es kann zu Fehlern beim Pap-Abstrich oder der Biopsieentnahme und dessen Auswertung gekommen sein. In einigen Fällen liegt möglicherweise tatsächlich gar keine HPV-Infektion vor.

Fragestellung: Die vorliegende Arbeit untersucht die Frage, ob diskrepante Befunde zwischen einem hochsensitiven genotypisierenden HPV-Test und zytologischen bzw. histologischen Befunden durch nachfolgende Untersuchungen aufgeklärt und die Ursache der Diskrepanzen definiert werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Rekrutierung von Patientinnendaten und -proben

Im Zeitraum von März 2010 bis einschließlich März 2011 wurden aus dem Datensatz des GTI-Labors (Labor für gynäkologische Tumorummunologie) am CBF (Campus Benjamin Franklin der Charité-Universitätsmedizin Berlin) 1.254 Patientinnendaten in Bezug auf ihren HPV-Status, Pap-Befund und ihre histologische Untersuchung überprüft. Die Patientinnen waren zuvor entweder am CCM (Campus Mitte der Charité-Universitätsmedizin Berlin) oder CBF in gynäkologischer Behandlung gewesen. Hier wurde ihnen neben Gewebeproben der Portio und des Zervikalkanals auch Material für einen HPV-Test entnommen. Der HPV-Test war durch das GTI-Labor am CBF durchgeführt und ausgewertet worden. Hierzu hatte mit Hilfe von laboreigenen Primern für GP-5+/6+ eine PCR stattgefunden (Protokoll siehe Anhang, Seite 69 - 72). Im Anschluss daran waren nach Denaturierung und durch Hybridisierung im laboreigenen Mastermix vorhandene amplifizierte virale DNA-Fragmente gebunden und mit Hilfe eines Luminex Analysators ausgewertet worden. Die DNA-Aufbereitung hatte aufgrund dieser vorangegangenen HPV-Tests bereits stattgefunden, so dass die DNA der aktuellen Arbeit für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand. Im GTI-Labor wurde allen 160 den Einschlusskriterien entsprechenden Patientinnen jeweils eine DNA-Probe zugeordnet, welche in die aktuelle Arbeit eingeschlossen und erneuten Untersuchungen unterzogen wurde. Die Namen aller Patientinnen wurden zur Anonymisierung durch GTI-Labornummern ersetzt.

3.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In die aktuelle Arbeit eingeschlossen wurden weibliche Patienten aus dem Datensatz des GTI-Labors am CBF aus dem Zeitraum von März 2010 bis einschließlich März 2011. Die ausgewählten Patientinnen wiesen zum Untersuchungszeitpunkt einen negativen HPV-Test auf, gleichzeitig jedoch einen Pap-Abstrich von Pap IIIId bis V nach der 2. Münchener Nomenklatur und/oder ein histologisch auffälliges Untersuchungsergebnis. Da die Untersuchungen an der Charité zu einem großen Teil im Rahmen des Vorsorgescreenings erfolgten, wurden viele Patientinnen mit ausschließlich zytologischem Untersuchungsergebnis eingeschlossen. Lag zusätzlich ein histologisches Ergebnis vor, welches im Rahmen der Differentialkolposkopie als

Goldstandard zur minimal invasiven histologischen Abklärung bei Auffälligkeiten in der Primäruntersuchung genutzt wird, wurde dieses Ergebnis ebenfalls in der Arbeit berücksichtigt. Das Fehlen einer histologischen Abklärung war jedoch kein Ausschlusskriterium für die Auswertung der Patientinnenprobe. Von den 1.254 untersuchten Patientinnen entsprachen 160 den Einschlusskriterien. Die übrigen Patientinnen wurden aufgrund eines positiven HPV-Tests oder der fehlenden zytologischen und histologischen Auffälligkeit ausgeschlossen.

3.3 Multimetrix und Luminexanalyse

Zur Detektion und Typisierung von HPV kamen das Multiplex HPV Genotyping Kit for Research in Epidemiology der Firma Multimetrix GmbH ((40) siehe Anhang, Seite 73 - 80) nach Schmitt et al. 2006 (41) und ein Luminex Analysesystem (Bio-Plex 200, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) zum Einsatz.

3.3.1 Multimetrix-PCR

Aus den Zervixabstrichen bereits extrahiertes DNA-Material wurde zunächst mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Im Multimetrix-Kit war hierzu ein biotinyliertes Primer-Set 1 zur Detektion der folgenden 24 HPV-Typen enthalten:

LR-HPV:	6, 11, 42, 43, 44, 70
HR-HPV:	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Möglicherweise HR-HPV:	26, 53, 66, 68, 73, 82

Zum Nachweis, dass die Proben genügend menschliche DNA enthielten, wurde der PCR zusätzlich ein Primer-Set 2 zur Amplifikation eines β -Globin Genfragments hinzugefügt. Eine Negativprobe mit nukleasefreiem Wasser ohne menschliche DNA diente dem Ausschluss einer Kontamination des Mastermixes mit HPV-DNA während der PCR-Amplifikation und dem weiteren Testverlauf.

Der erste Zyklus (L110324) enthielt 76, der zweite (L110405) 92 Proben. Die folgenden Schritte wurden in einem Labor durchgeführt, welches frei von PCR-Produkten, Plasmid-DNA und genomischen DNA-Proben gehalten wird. Für jede Probe wurde ein 0,2 ml „Thermo Tube“, welcher DNA und RNA frei ist, mit der laborinternen Patientinnenummer beschriftet. Zusätzlich wurde ein Tube für die Mastermix-Kontrolle (Negativkontrolle), einer für die HPV-Mix-Kontrolle (Positivkontrolle) und ein weiterer für

die Hybridisierungskontrolle beschriftet. Alle Tubes wurden in eine 96-Well PCR-Platte einsortiert.

Es wurde ein Mastermix entsprechend des Protokolls (40) erstellt. Ein Mastermix-Ansatz von 40 µl enthält demnach:

Primer-Set 1:	2 µl
Primer-Set 2:	0,5 µl
10xPCR Gold Puffer:	5 µl
25 mM MgCl ₂ :	7 µl
dNTP Mix:	1 µl (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
nukleasefreies Wasser:	24,3 µl
AmpliTaq Gold PCR-Polymerase:	0,2 µl

Die 0,2 µl AmpliTaq Gold PCR-Polymerase wurden erst kurz vor Beginn der PCR hinzugefügt. Im Gegensatz zum Protokoll wurde in jedes 0,2 ml PCR-Gefäß nur die Hälfte (20 µl) des Mastermixes pipettiert. Diese wurden dann auf Eis gestellt, um einer vorzeitigen DNA-Amplifikation durch die Taq-Polymerase bei Verunreinigung entgegen zu wirken. Der Negativprobe wurden 5 µl nukleasefreies Wasser beigemischt.

Nach einem Laborwechsel konnten die nun folgenden Schritte durchgeführt werden. Jedem PCR-Gefäß, mit Ausnahme der Negativkontrolle, wurde die Hälfte der im Protokoll angegeben Patientinnen-DNA, nämlich 5 µl, hinzugefügt. Hierbei wurde besonders darauf geachtet jeweils nur ein Gefäß zu öffnen, mit der Patientinnen-DNA zu füllen und anschließend sofort wieder zu verschließen, um eine Kontamination zu vermeiden.

Die 96-Well Platte mit den PCR-Gefäßen wurde gemäß dem PCR-Protokoll (40) durch den Thermocycler, welcher räumlich von den vorangegangenen Laboratorien getrennt steht, behandelt. Hierbei wurden die Proben initial zur Denaturierung für 15 min auf 94 °C erhitzt. Darauf folgten 40 Zyklen von Denaturierung (20 Sek. bei 94 °C), Primerhybridisierung (30 Sek. bei 38 °C) und Elongation (80 Sek. bei 71 °C). Zum Abschluss folgte eine vierminütige DNA-Elongation bei 71 °C.

3.3.2 HPV-Typisierung und Quantifizierung mit Luminex

Ein Bead, auch Mikrosphäre genannt, besteht aus einem 5,6 µm großen sphärischen Polystyrolpartikel. Diese sind in jeweils zehn unterschiedlichen Konzentrationsstufen mit Fluoreszenzfarbstoffen (rot und infrarot) angefärbt. Durch deren Kombination ergibt sich eine aus 100 Beads bestehende Population, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Schattierung aus rot und infrarot differenziert werden kann. Die Beads sind an unterschiedliche HPV-typenspezifische Oligonukleotidsonden gekoppelt, wodurch sie den bestimmten HPV-Typen zugeordnet werden können. Jede Mikrosphäre bindet die DNA eines bestimmten HPV-Typen, wodurch eine Typisierung ermöglicht wird. Durch Denaturierung der DNA und anschließende Hybridisierung binden die Beads an die entsprechenden HPV-DNA-Abschnitte. Des Weiteren besitzen die Beads die Fähigkeit nach der Bindung der DNA über ein mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes Konjugat, in diesem Fall R-Phycoerythrin, grünes Licht zu emittieren. Im Luminex-Analysesystem kann nun nicht nur der rote und infrarote Bereich zur Detektion und Typisierung der HPV-DNA, sondern auch das grüne Licht zur Quantifizierung der vorhandenen DNA ausgewertet werden.

3.3.2.1 Vorbereitung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden auf eine Hybridisierungsplatte überführt. Hier wurde der im Kit enthaltene Beadmix zugefügt. Für den Zyklus L110324 wurde dabei nach Protokoll (40) verfahren, so dass zu 10 µl PCR-Produkt je 40 µl Beadmix und 1 µl Hybridisierungskontrolle aus dem Kit pipettiert wurden. Beim Zyklus L110405 wurde die Beadmixmenge aus dem Kit halbiert, so dass auf 10 µl PCR-Produkt 20 µl Beadmix und 20 µl laboreigener Hybridisierungspuffer kamen.

Zur Kontrolle dienten für jeden Zyklus jeweils eine Positiv-, eine Negativ- und eine Hybridisierungskontrolle. Anstatt des PCR-Produktes wurden der Positivkontrolle 5 µl laboreigener HPV-Mix, 10 µl Beadmix und 10 µl Hybridisierungspuffer beigemischt. Die Negativkontrolle wurde mit dem Mastermix und nukleasefreiem Wasser bereits vor der PCR angesetzt. Die Hybridisierungskontrolle enthielt 9 µl Wasser und 1 µl Hybridisierungskontrolle aus dem Kit anstatt des PCR-Produktes. Die restlichen Bestandteile entsprachen den Proben, die PCR-Produkte enthielten.

Die Proben mit dem PCR-Beadmix-Gemisch und die Kontrollproben wurden nun für 10 Min. bei 95 °C im Inkubationsofen denaturiert, im Anschluss auf Eis abgekühlt und nach einer Minute in den Thermomixer überführt. Für 30 Min. bei 41 °C wurden sie unter Lichtschutz und leichter Rotation (500 UpM) auf dem Thermomixer hybridisiert. Je nach Vorhandensein von viraler DNA bindet diese hierbei an die typenspezifischen Oligonukleotidsonden der Beads. Je höher die virale DNA-Konzentration, desto mehr kann durch die Sonden gebunden und später quantifiziert werden.

Es folgte eine Waschung auf einer Filterplatte mit Hilfe eines Waschpuffers, um ungebundene PCR-Produkte zu entfernen. Hierzu wurde das PCR-Beadmix-Gemisch von der Hybridisierungsplatte in die Filterplatte übertragen und dieser 100 µl Waschpuffer beigemischt. Durch Vakuum Filtration wurde der Waschpuffer mitsamt den ungebundenen PCR-Produkten abgesaugt. Im Anschluss musste die Bodenplatte durch ein Filtertuch getrocknet werden, da sonst der Puffer ausläuft.

Zur Färbung kamen zu jeder Probe 70 µl Staining Solution, die sich im Verhältnis 1:10 aus der Mischung von Konjugat und Staining Puffer zusammensetzt. Das Konjugat, bestehend aus R-Phycoerythrin, ist an Streptavidin gebunden. Auf Grund der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin kann Streptavidin an die PCR-Produkte binden, welche durch die biotinylierten Primer Biotin-Moleküle tragen. Unter Lichtschutz und Rotation (250 UpM) wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 30 Min. auf dem horizontalen Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut dreimal der oben beschriebenen Waschung unterzogen, um nicht gebundenen Fluoreszenzfarbstoff zu entfernen. Die Proben wurden dann mit 100 µl Waschpuffer aufgefüllt und durch das Luminex-Analysesystem ausgelesen.

3.3.2.2 Messung durch das Luminex-Analysesystem

In einer Mantelflüssigkeit umhüllt werden die Proben durch die zwei unterschiedlichen Laser des Luminex-Durchflusszytometers geleitet. Die Laser regen die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe an, so dass diese zum einen Licht der Wellenlänge im Bereich 645 bis 669 nm bzw. > 712 nm zur Unterscheidung der unterschiedlichen HPV-Typen, zum anderen Licht im Wellenlängenbereich von 563 bis 587 nm zur Quantifizierung der HPV-Menge emittieren. Die emittierte Lichtintensität steigt proportional zur HPV-Menge. Die Messwerte werden durch das Analysesystem digitalisiert und als Mediane

Fluoreszenz Intensität (MFI) und in graphischen Darstellungen wiedergegeben. Die MFI wurde zur Auswertung herangezogen. Für jeden HPV-Typen gibt es einen bestimmten Negativ- bzw. Hintergrundwert. Wird dieser um das Dreifache überschritten, so gilt die Probe als HPV-positiv. Beträgt der MFI-Wert das Zwei- bis Dreifache, gilt die Probe als grenzwertig, alle darunter liegenden MFI-Werte werden als HPV-negativ eingestuft. Auch für das β -Globin MFI-Signal gilt es den Hintergrundwert um das Dreifache zu überschreiten, damit von einer ausreichenden DNA-Menge bzw. einer effizienten PCR ausgegangen werden kann.

3.4 Ermittlung seltener HPV-Typen

Von allen Patientinnen mit einem auch nach der Multimetrix-Testung weiterhin negativen HPV-Ergebnis wurden jeweils 10 μ l Probenmaterial an das Deutsche Krebsforschungszentrum Heidelberg zur Nachuntersuchung verschickt. Dies entsprach einer Gesamtmenge von 57 verschickten Proben, da zu einer Probe nicht mehr genug Material vorhanden war. In Heidelberg untersuchte man die Proben auch mit Hilfe des multiplexen Analysesystems, allerdings auf insgesamt 55 HPV-Typen. Hierzu zählten auch viele seltenere Typen, für die im vorher beschriebenen Multimetrix-Kit keine Primer/Sonden enthalten waren. Sofern HPV gefunden wurden, folgte eine Abschätzung der Viruslast für die entsprechenden Proben. Folgende HPV-Typen wurden in Heidelberg in die Untersuchungen mit eingeschlossen (zum Multimetrix-Kit unterschiedliche HPV-Typen sind unterstrichen):

6, 7, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68a, 68b, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 97, 102, 106, 114.

3.5 E7-Multiplex-PCR

An das Labor für Gynäkologische Molekularbiologie der Frauenklinik in Jena wurden ebenfalls 57 Proben mit 10 μ l Probenmaterial pro Patientin verschickt und durch zwei Verfahren erneut untersucht. Zum einen wurde die E7-Multiplex-PCR genutzt. Hierbei wird mit Hilfe von spezifischen E7-Primern die Onkogenregion E7 anstelle des sonst üblichen L1-Genabschnitts amplifiziert (42). Die Onkogene E6 und E7 inaktivieren die Tumorsuppressoren p53 bzw. Retinoblastoma bindendes Protein (pRb), wodurch die Karzinogenese schneller fortschreitet (43). Wenn die Onkogene E6 und E7 bei der

Integration der viralen DNA in die Wirts-DNA unbeschädigt bleiben, behält das Virus seine Onkogenität, kann jedoch im Falle eines L1-Verlustes für L1-basierte HPV-Tests nicht mehr nachweisbar sein (31). Durch die in Jena genutzte E7-Multiplex-PCR werden ausschließlich die sieben klinisch relevantesten HR-HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58 nachgewiesen (42).

In Jena wurden die Proben außerdem noch einmal durch einen GP-5+/6+-PCR-EIA nach Jacobs et al. untersucht (44). Hierbei wird durch generelle Primer der Genabschnitt für L1 amplifiziert. Zur HPV-Typisierung folgt im Anschluss ein Enzymimmunoassay.

3.6 Reevaluation zytologischer Befunde

Zur Prüfung, ob die nach der Testung mit dem Multimetrix-Kit HPV-negativ gebliebenen Proben auch durch andere Gutachter den zytologischen Einschlusskriterien entsprochen hätten, wurden zu 50 Patientinnen auf Objektträgern fixierte Abstriche aus den Archiven des Labors für gynäkologische Tumormimmunologie herausgesucht und verblindet an das Institut für gynäkologische Zytologie und Morphologie um Dr. med. Coumbos, Prof. Dr. med. Kühn und Kollegen verschickt. Es handelte sich meist um zwei Abstriche pro Patientin, einen von der Portio und einen vom Zervikalkanal. Zu sieben Patientinnen konnte kein Abstrichmaterial mehr auffindig gemacht werden. Durch das Labor von Prof. Dr. med. Kühn wurden insgesamt 82 Objektträger begutachtet. Hier wurde aus den Abstrichen der Portio und des Zervikalkanals der aussagekräftigere ausgewählt, da die Qualität der Abstriche zum Teil sehr stark schwankte. Gab es keinen Unterschied in der Qualität der Abstriche, wurden beide ausgewählt. Die somit verbliebenen 52 Objektträger wurden an das zytologische Labor der Gemeinschaftspraxis und Zytologielabor Dres. med. Perlitz in Haldensleben und an das MVZ für Zytologie und Molekularbiologie an Herrn PD Dr. med. Ikenberg versandt. Hier wurden die Abstriche erneut verblindet evaluiert. Da nur zu den wenigsten Patientinnen histologische Schnitte vorhanden waren und ein Teil der Gutachter keine Qualifikation für deren Begutachtung besaß, wurden diese nicht erneut evaluiert. Allen Gutachtern waren die ursprünglichen zytologischen und histologischen Befunde der Charité und die Ergebnisse aus der Reevaluation durch die begutachtenden Kollegen unbekannt.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse im Überblick

Aus dem Datensatz der 1.254 Patientinnen entsprachen 160 den Einschlusskriterien. Demnach waren 12,76 % der untersuchten Patientinnen HPV-negativ, trotz eines Pap IIIId oder höher bzw. CIN I, VAIN I oder höher. Mit Hilfe des Multiplex HPV Genotyping Kits der Firma Multimetrix wurden die 160 HPV-Abstriche im GTI-Labor erneut auf HPV untersucht. Die Untersuchungen fanden in zwei Zyklen statt. Im ersten Zyklus L110324 wurden 76 Proben untersucht, der zweite L110405 umfasste 92 Proben, hierunter waren 8 Proben, welche aus dem ersten Zyklus wiederholt werden mussten. 102 Proben waren in den beiden Zyklen HPV-positiv und somit zuvor falsch-negativ. Es ergaben sich 58 weiterhin HPV-negative Proben, von denen 57 jeweils an die Labore in Heidelberg und Jena verschickt werden konnten. Zu einer Probe lag nicht genug Material für weitere Untersuchungen vor. In Heidelberg wurden die Proben auf insgesamt 55 HPV-Typen untersucht, um auch seltene vom GTI-Labor und dem Multimetrix-Kit nicht untersuchte HPV-Typen zu erfassen. Gleichzeitig wurde bei HPV-positiven Proben die Viruslast ermittelt. Aufgrund eines möglichen Verlustes der L1 Region durch Integration der viralen in die menschliche DNA wurden die Proben in Jena im Hinblick auf das Onkogen E7 untersucht. Im Anschluss wurden 50 zytologische Gewebstücke durch drei Gutachter reevaluiert, um die Einschlusskriterien zu bestätigen oder gegebenenfalls zu widerlegen. Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Proben innerhalb der aktuellen Studie.

Ergebnisse

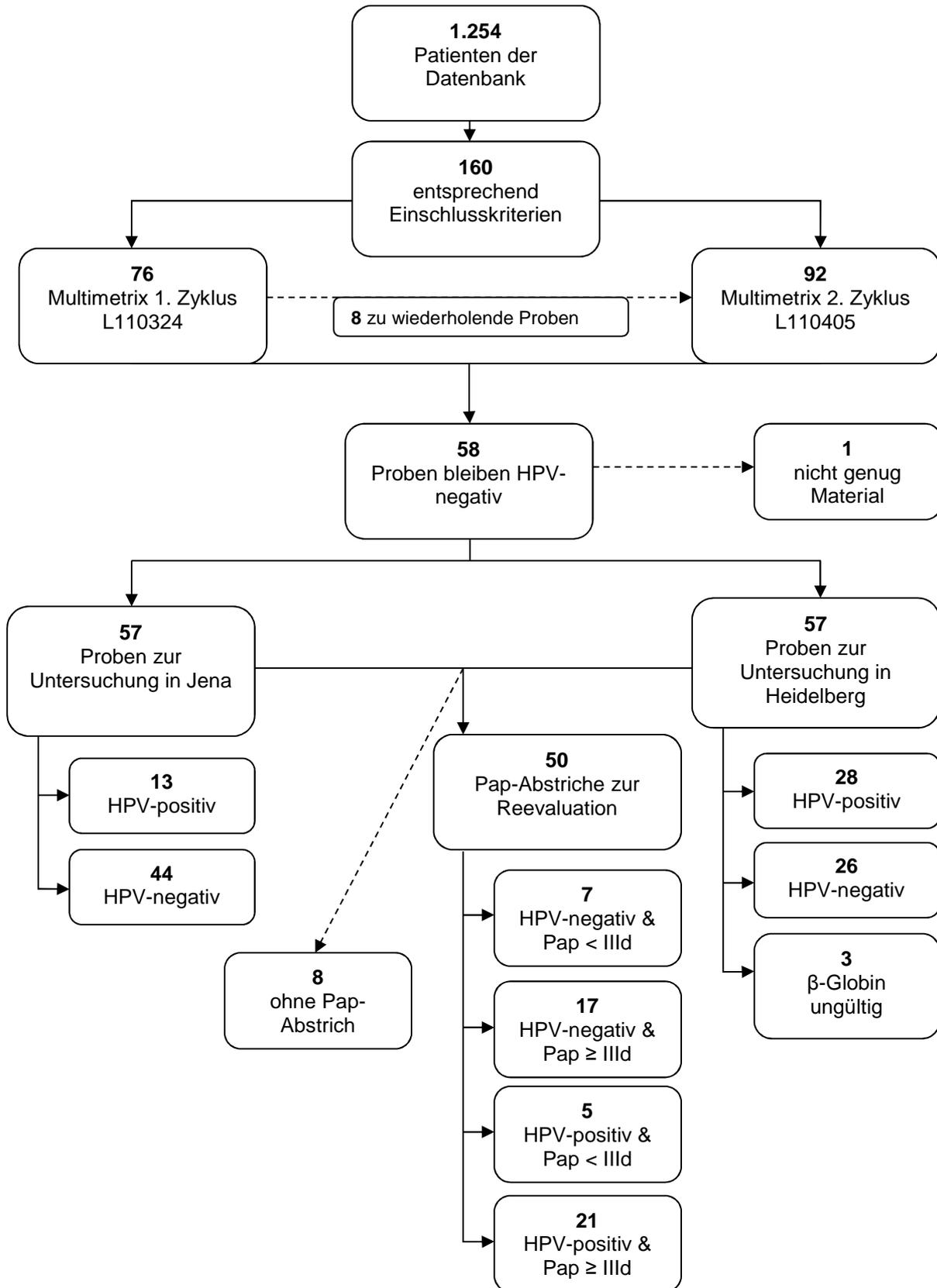


Abb. 3: Überblick der Proben im Verlauf: Angegeben sind die Anzahl der jeweiligen Proben und deren Eigenschaften in HPV-Testung und Zytologie.

4.2 Patientinnenkollektiv im Überblick

Zu den 160 bis dato HPV-negativen Patientinnen lag für 143 Patientinnen ein Pap-Ergebnis und für 91 das Ergebnis einer histologischen Untersuchung der Charité vor.

Die Ergebnisse der zytologischen Untersuchung teilten sich wie folgt auf:

Pap II:	4 Patientinnen
Pap III:	2 Patientinnen
Pap IIIId:	73 Patientinnen
Pap IVa:	57 Patientinnen
Pap IVb:	1 Patientin
Pap V:	6 Patientinnen

Zu 17 Patientinnen lag kein Pap-Abstrich vor.

Die histologischen Ergebnisse waren unterteilt in:

CIN I:	17 Patientinnen
CIN II:	17 Patientinnen
CIN III/CIS:	37 Patientinnen
VAIN II:	2 Patientinnen
VAIN III:	2 Patientinnen
Adenokarzinom der Cervix:	2 Patientinnen
Adenokarzinom der Vagina:	1 Patientin

Bei 13 Patientinnen gab es keinen Hinweis auf eine CIN. Zu 69 Patientinnen lag kein histologisches Untersuchungsergebnis vor.

War das Untersuchungsergebnis nicht eindeutig, wurde für die Auswertung der höhergradige Befund gezählt, da hierfür zumindest Anzeichen vorliegen mussten. Dies war für einen zytologischen Befund der Fall, der mit Pap II-IVa angegeben und somit als Pap IVa gewertet wurde. Weiter betraf es elf histologische Befunde, die als CIN I bis II (2 x), II bis III (4 x), I bis III (3 x), VAIN I bis II (1 x) und VAIN II bis III (1 x) angegeben waren und dem jeweils höheren Befund zugeordnet wurden. CIN III und CIS wurden gemäß der neuen Klassifikation als CIN III zusammengefasst.

Betrachtet man die Befundergebnisse in Kombination, so ergeben sich die in Tabelle 8 dargestellten Konstellationen.

Ergebnisse

Tab. 8: Anzahl zytologischer und histologischer Befunde in Kombination

Histologie Zytologie	CIN I	CIN II	CIN III	VAIN II	VAIN III	Adeno-Ca.		kein Hinweis ^{a)}	ohne Histologie ^{b)}
						cerv.	vag.		
Pap II	1	1			1	1			
Pap III			2						
Pap IIIId	9	10	3	1				9	41
Pap IVa	3	2	25		1			4	22
Pap IVb									1
Pap V			1						5
ohne Zytologie ^{b)}	4	4	6	1		1	1		

a) keine histologische Atypie vorhanden; b) kein Befund vorliegend.

Adeno-Ca. = Adenokarzinom; cerv. = zervikal; vag. = vaginal; Pap = Pap-Abstrich Befund nach 2. Münchner Nomenklatur; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie; VAIN = vaginale intraepitheliale Neoplasie.

4.3 Reevaluation mit Multiplex HPV Genotyping Kit

Mit dem Multiplex HPV Genotyping Kit wurden die 160 HPV-negativen Proben in zwei Zyklen erneut auf HPV überprüft. In den ersten Zyklus wurden 76, in den zweiten 92 Proben eingeschlossen. Acht der 92 Proben waren aus dem ersten Zyklus zur Wiederholung dabei.

Bei 54 Proben (71 %) des ersten Zyklus ließ sich bei der Wiederholung der PCR ein HPV-Befund feststellen. 15 Proben blieben negativ. Eine der HPV-positiven Proben zeigte eine zu geringe Anzahl von Messereignissen, weshalb sie mit sieben weiteren Proben, die aufgrund zu geringer Messereignisse zu keinem Ergebnis gekommen waren, im zweiten Zyklus wiederholt wurde. Hierbei bestätigte sich für diese Probe das HPV-positive Ergebnis. Von den 15 HPV-negativen Proben waren vier auch negativ für β -Globin. Diese Proben waren in einer laborinternen Testung durch eine hochsensitive PCR und anschließende 2 % Agarosegelaufreinigung positiv für β -Globin getestet worden. Tabelle 9 zeigt die zytologischen und histologischen Befunde der 15 HPV-negativen Proben.

Ergebnisse

Tab. 9: Histologie und Zytologie HPV-negativer Befunde (1. Zyklus)

Histologie Zytologie	CIN II	CIN III	kein Hinweis ^{a)}	ohne Histologie ^{b)}	Adenokarzinom der Vagina
Pap III d	1		6	3	
Pap IV a		2	1	1	
ohne Zytologie ^{b)}					1

a) keine histologische Atypie vorhanden; b) kein Befund vorliegend.

Pap = Pap-Abstrich Befund nach 2. Münchner Nomenklatur; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie.

In den HPV-positiv getesteten Proben konnte 99-mal HPV festgestellt werden. Die folgenden HPV-Typen waren in absteigender Reihenfolge z. T. als Mischinfektionen nachzuweisen:

HPV 16 (22 x), 31 (12 x), 33 (9 x), 66 (7 x), 18 und 51 (je 6 x), 58 und 59 (je 5 x), 42 und 56 (je 4 x), 52 und 82 (je 3 x), 43, 45 und 53 (je 2 x), 6, 26, 35, 39, 44, 70 und 73 (je 1 x).

Tabelle 10 gibt die HPV-Typen und die zugehörigen zytologischen und histologischen Befunde wieder.

Tab. 10: HPV-Befund mit zytologischem und histologischem Befund (1. Zyklus)

Histologie Zytologie	CIN I	CIN II	CIN III	Adeno-Ca. zervikal	kein Hinweis ^{a)}	ohne Histologie ^{b)}
Pap II				(18, 56gr, 42gr)		
Pap III			(16, 31)			
Pap III d	(33); (33, 45); (18, 66, 6gr)	(33); (43); (39); (58)	(42)		(16, 66, 42, 52gr); (33)	(59, 51gr); (31); (16, 52); (31); (58gr); (16, 18); (16); (51, 82gr); (73)
Pap IV a	(16*); (16)	(16, 31); (16, 51, 82gr)	(33); (31, 66); (16, 58, 59gr); (35gr, 53gr); (31); (33); (31); (58, 56gr); (16, 66)		(31); (31); (16)	(31, 16gr); (16, 33, 51); (58); (16); (31gr); (16, 53); (52); (44)
Pap IV b						(56, 16gr, 31gr)
Pap V						(18); (70); (16, 82)
ohne Zytologie ^{b)}	(16, 18, 33, 51, 59, 26gr, 43gr, 45gr)		(16, 33, 66, 59gr); (16, 59, 66gr); (18)	(16, 42, 51, 56, 66)		

a) keine histologische Atypie vorhanden; b) kein Befund vorliegend.

Infektionen einer Patientin sind in Klammern gesetzt, Infektionen unterschiedlicher Patientinnen durch ein Semikolon getrennt. Pap = Pap-Abstrich Befund nach 2. Münchner Nomenklatur; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie; Adeno-Ca. = Adenokarzinom; gr = grenzwertig; 16* = HPV 16 gefunden in der Probe, die im 2. Zyklus wiederholt wurde.

Ergebnisse

Im zweiten Zyklus L110405 wurden in 49 der 92 Proben HPV-Befunde gefunden, dies entspricht 53 %. 43 Proben blieben weiterhin HPV-negativ. Davon waren 30 Proben auch für β -Globin negativ, was sich bei einer Nachuntersuchung nicht bestätigte. Vier der 43 negativen Proben ließen eine HPV-Infektion vermuten, da die MFI-Werte grenzwertig erhöht waren. Die Werte erreichten jedoch kaum das Zweifache des als Schwellenwert gesetzten Hintergrundwerts, weshalb drei der Proben als negativ gewertet und mit den anderen Proben weiteren Untersuchungen unterzogen wurden. Die Vierte konnte aufgrund fehlenden Materials nicht weiter untersucht werden.

Die zytologischen und histologischen Befunde der 43 negativen Proben sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tab. 11: Zytologie und Histologie HPV-negativer Befunde (2. Zyklus)

Histologie Zytologie	CIN I	CIN II	CIN III	VAIN III	ohne Histologie ^{a)}
Pap II		1			
Pap IIIId	5	3	1		20
Pap IVa	1		5	1	2
ohne Zytologie ^{a)}	2	2			

a) kein Befund vorliegend.

Pap = Pap-Abstrich Befund nach 2. Münchner Nomenklatur; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie; VAIN = vaginale intraepitheliale Neoplasie.

In den HPV-positiven Proben wurde 86-mal HPV gefunden. Tabelle 12 zeigt die HPV-Typen und zugehörige zytologische und histologische Befunde. Folgende HPV-Typen waren in absteigender Reihenfolge z. T. als Mischinfektionen nachzuweisen:

HPV 16 (25 x), 52 und 82 (je 7 x), 53 und 56 (je 5 x), 33, 66 und 70 (je 4 x), 11 und 31 (je 3 x), 6, 18, 39, 42, 45, 51, 58 und 59 (je 2 x), 35, 43, und 73 (je 1 x).

Ergebnisse

Tab. 12: HPV-Befund mit zytologischem und histologischem Befund (2. Zyklus)

Histologie \ Zytologie	CIN I	CIN II	CIN III	VAIN II	VAIN III	kein Hinweis ^{a)}	ohne Histologie ^{b)}
Pap II	(16)				(16)		
Pap III			(16, 56)				
Pap III d	(52, 43)	(35, 82, 11); (33, 59gr)	(66)	(16, 66)		(16, 18, 11, 42)	(16, 66, 52gr); (16); (18); (16gr); (31); (33); (82); (58gr); (56)
Pap IV a	(16)		(16); (16); (31, 16gr); (51, 82gr); (16, 70, 39gr); (82gr); (52); (33, 53, 56); (82)				(6); (6, 16); (16); (16); (16); (16gr); (16, 70); (16, 33); (52); (53); (53)
Pap V			(16)				(16); (53, 56, 82, 39gr, 11, 42gr)
ohne Zytologie ^{b)}	(51, 82gr)	(16, 52, 56); (45, 70, 16gr)	(16, 45, 53, 66, 70, 73gr); (52, 58, 31gr); (59)	(52)			

a) keine histologische Atypie vorhanden; b) kein Befund vorliegend.

Infektionen einer Patientin sind in Klammern gesetzt, Infektionen unterschiedlicher Patientinnen durch ein Semikolon getrennt. Pap = Pap-Abstrich Befund nach 2. Münchner Nomenklatur; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie; VAIN = vaginale intraepitheliale Neoplasie; gr = grenzwertig.

Insgesamt ergibt sich aus beiden Zyklen, dass trotz pathologischer zytologischer und histologischer Befunde 58 von 160 Proben weiterhin HPV-negativ bleiben. Für 102 Proben konnte allerdings die Diskrepanz zwischen positivem klinischen Befund und negativem HPV-Befund durch Nachweis einer Infektion aufgelöst werden, dies entspricht 64 %. Von einer der 58 Proben war nicht mehr genug Material vorhanden, so dass sie vom weiteren Studienverlauf ausgeschlossen werden musste. Der dazugehörige Pap-Abstrich hatte III d ergeben, eine Histologie lag nicht vor. Diese Probe war eine der vier sehr stark grenzwertigen und deshalb als negativ gewerteten Proben, in diesem Fall für den LR-HPV-Typ 44.

Von den übrigen 57 Proben wurden im Verlauf jeweils 10 µl DNA-Material in die Labore nach Jena und Heidelberg geschickt, um weitere Untersuchungen durchzuführen. Als Kontrolle dienten acht HPV-positive Proben aus dem GTI-Labor, zwei davon mit Mischinfektionen.

4.4 Reevaluation mit erweitertem HPV-Spektrum

In Heidelberg wurden die 57 Proben auf insgesamt 55 HPV-Typen untersucht, gleichzeitig wurde eine Einschätzung über die Viruslast vorgenommen. Hierbei ergab

sich ein HPV-positives Ergebnis in 28 Proben. Aufgrund von Mischinfektionen wurde insgesamt 44-mal HPV nachgewiesen. Bei drei Proben war die Messung wegen ungenügender Menge an DNA-Material für ungültig deklariert worden. Diese drei Proben waren in Berlin jedoch positiv für β -Globin gewesen. Die acht Positivkontrollen stimmten mit den Ergebnissen aus Berlin größtenteils überein. Bei einer Positivkontrolle wurde zusätzlich der HPV-Typ 90 festgestellt. Bei den beiden Mischinfektionen wurden etwas weniger HPV-Typen detektiert, als in Berlin (HPV 45, 53, 66, 70, 73 gegenüber HPV 16, 45, 53, 66, 70, 73 gr. und HPV 16, 33 gegenüber HPV 16, 18, 33, 51, 59, 26 gr., 43 gr., 45 gr.).

Zunächst sind die histologischen und zytologischen Befunde von 26 weiterhin negativen Proben in Tabelle 13 dargestellt. Zu den drei Proben mit ungenügend DNA-Material gehörte ein Pap IIIId, CIN I Befund und zwei CIN I Befunde ohne Zytologie. Sie sind in Tabelle 13 nicht wiedergegeben.

Tab. 13: Zytologie und Histologie HPV-negativer Befunde (Heidelberg)

Histologie \ Zytologie	CIN I	CIN II	CIN III	Adeno-Ca. vag.	kein Hinweis ^{a)}	ohne Histologie ^{b)}
Pap IIIId	1	1			6	13
Pap IVa			1		1	
ohne Zytologie ^{b)}		2		1		

a) keine histologische Atypie vorhanden; b) kein Befund vorliegend.

Adeno-Ca. = Adenokarzinom; vag. = vaginal; Pap = Pap-Abstrich Befund nach 2. Münchner Nomenklatur; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie.

In den 28 HPV-positiven Proben konnte insgesamt 44-mal HPV nachgewiesen werden. Darunter waren sieben HPV-Typen (17 HPV-Nachweise), deren Primer weder im Multimetrix-Kit noch im GTI-Labor genutzt werden. Folgende HPV-Typen wurden in absteigender Reihenfolge gefunden:

HPV 31 und 91 (je 5 x), HPV 33 (4 x), HPV 30, 51 und 67 (je 3 x), 53, 55, 58 und 62 (je 2 x), 11, 16, 42, 34, 44, 45, 52, 61, 66, 68a, 70, 82 und 87 (je 1 x).

Eine Zusammenfassung inklusive Viruslasteinschätzung zeigt Tabelle 14.

Ergebnisse

Tab. 14: HPV-Befund mit zytologischem und histologischem Befund und Virulasteinschätzung (Heidelberg)

Histologie Zytologie	CIN I	CIN II	CIN III	VAIN III	ohne Histologie ^{a)}
Pap II		(61↑)			
Pap III					
Pap III d	(82↑); (91↑); (31↑)	(31↑, 43↑, 55↑, 62↑); (66↓, 68a↓); (30↑, 62↓)	(11↓, 45↓, 51↓, 53↓)		(33↑); (30↓); (42↑, 58↓); (33↑); (31↓); (55↑, 91↑); (91↓); (51↑); (52↓)
Pap IVa	(51↑, 87↓)		(16↑); (31↑, 67↑, 70↑); (33↓); (31↑, 67↑, 91↑); (53↓); (58↑)	(44↑, 91↑)	(67↑); (33↑); (30↑)

a) kein Befund vorliegend.

Infektionen einer Patientin sind in Klammern gesetzt, Infektionen unterschiedlicher Patientinnen durch ein Semikolon getrennt; nach gelb markierten HPV-Typen wurde nur in Heidelberg gescreent. Pap = Pap-Abstrich Befund nach 2. Münchner Nomenklatur; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie; VAIN = vaginale intraepitheliale Neoplasie; ↑ = hohe Viruslast; ↓ = niedrige Viruslast.

4.5 Ergebnisse der E7-Multiplex-PCR

In Jena wurden die Proben durch die E7-Multiplex-PCR auf die sieben häufigsten HPV-Typen, nämlich HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58, untersucht. In 13 der 57 Proben wurde hierbei HPV gefunden. Im Anschluss daran wurde ein GP-5+/6+-PCR-EIA durchgeführt, um die Ergebnisse zu vergleichen. Eine Probe war negativ für β-Globin. Es handelte sich um einen Pap III d Befund (er ist in Tabelle 15 nicht dargestellt). Diese Probe war zuvor in Berlin β-Globin positiv gewesen. Die Tabelle 15 zeigt die Histologie und Zytologie der restlichen HPV-negativen Proben.

Tab. 15: Zytologie und Histologie HPV-negativer Befunde (Jena)

Histologie Zytologie	CIN I	CIN II	CIN III	VAIN III	Adeno-Ca. vag.	kein Hinweis ^{a)}	ohne Histologie ^{b)}
Pap III d	4	3	1			6	17
Pap IVa	1		3	1		1	2
ohne Zytologie ^{b)}	1	2			1		

a) keine histologische Atypie vorhanden; b) kein Befund vorliegend.

Pap = Pap-Abstrich Befund nach 2. Münchner Nomenklatur; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie; VAIN = vaginale intraepitheliale Neoplasie; Adeno-Ca. = Adenokarzinom; vag. = vaginal.

Durch die E7-Multiplex-PCR konnten die folgenden HPV-Typen in absteigender Reihenfolge nachgewiesen werden, es wurden keine Mischinfektionen festgestellt:
HPV 31 (6 x), HPV 16 und 58 (je 2 x), HPV 33, 45 und 52 (je 1 x).

Ergebnisse

Sie sind in Tabelle 16 mit dem zugehörigen histologischen und zytologischen Befund dargestellt.

Tab. 16: HPV-Befund mit zytologischem und histologischem Befund (Jena)

Histologie Zytologie	CIN I	CIN II	CIN III	ohne Histologie ^{a)}
Pap II		31		
Pap III/d	31	31		31; 45; 52; 58
Pap IVa			16; 31; 31; 58	33
ohne Zytologie ^{a)}	16			

a) kein Befund vorliegend.

Infektionen unterschiedlicher Patientinnen sind durch ein Semikolon getrennt. Pap = Pap-Abstrich Befund nach 2. Münchner Nomenklatur; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie.

Die Positivkontrollen stimmten nur zum Teil überein. Eine der Positivkontrollen war in Jena negativ. Es handelte sich hierbei um eine der beiden Mischinfektionsproben. Bei der zweiten Probe mit der Mischinfektion wurde nur HPV 16, nicht jedoch 33 erkannt. Zwei der Proben waren positiv für HR-HPV, jedoch war die Probe, die in Berlin und Heidelberg positiv für HPV 52 war, in Jena positiv für HPV 58 und umgekehrt, was auf eine mögliche Verwechslung der Proben hindeutet.

In Jena wurden anschließend zwölf der 13 HPV-positiven Proben und sieben der acht Positivkontrollen mit dem GP-5+/6+-PCR-EIA nachuntersucht. Hierbei wurde eine Probe, die zuvor HPV 31 positiv war, negativ getestet. Zwei der Proben, die positiv für HPV 52 gewesen sind, hierunter eine der Positivkontrollen, waren im GP-5+/6+-PCR-EIA ebenfalls negativ. Für zwei Proben wurde eine HR-HPV-Infektion festgestellt, nicht jedoch für den Typen, den man zuvor in der E7-Multiplex-Analyse entdeckt hatte.

Die Ergebnisse der beiden Methoden sind im Vergleich in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17: HPV-Befund von E7-Multiplex-Analyse und GP-5+/6+-PCR-EIA im Vergleich

Proben-Nr.	E7-Multiplex-Analyse, HPV-Typ	GP-5+/6+-PCR-EIA, HPV-Typ
10-0592	45	HR, nicht 45
10-0595	31	31
10-0707	31	31
10-0709	31	negativ
10-0768	58	58
10-1120	33	33
11-0137	31	31
11-0192	58	58
11-0219	52	negativ
11-0241	31	31
11-0296	16	16
11-0297	31	31
10-0448 ^{a)}	33	33
10-0554 ^{a)}	58 ^{b)}	HR, nicht 58
10-0801 ^{a)}	16	16
10-0890 ^{a)}	31	31
10-0972 ^{a)}	18	18
10-1080 ^{a)}	16	16
11-0128 ^{a)}	52 ^{b)}	negativ

a) Positivkontrollen; b) potentielle Probenvertauschung.

GP-5+/6+-PCR-EIA = PCR mit GP-5+/6+ Primern und anschließendem Enzymimmunoassay; E7 = virales Onkogen; HR = High-risk; HPV = Humane Papillomviren; Nr. = Nummer.

4.6 Reevaluation der zytologischen Abstriche

Da der zytologische und histologische Befund sehr von Präparat und Gutachter abhängt, wurden die zytologischen Befunde erneut evaluiert. Zu sieben Patientinnen gab es keinen Pap-Abstrich. Insgesamt wurden 52 Pap-Abstriche von 50 Patientinnen durch drei verschiedene Gutachter reevaluiert. Zu zwei Patientinnen wurden zwei Präparate verschickt, wobei der jeweils schwerwiegendere Befund berücksichtigt wurde. Im Folgenden sind die Befunde deskriptiv dargestellt. Tabelle 18 zeigt die weiterhin HPV-negativen Proben mit den zytologischen Reevaluationsergebnissen. Tabelle 19 des nächsten Kapitels zeigt die Befunde der Gutachter im Vergleich einschließlich der gefundenen HPV-Infektionen.

Zwölf Pap-Abstriche wurden einvernehmlich mit Pap II oder Pap III bewertet und hätten den Einschlusskriterien aus zytologischer Sicht somit nicht entsprochen. Das Team um

Prof. Dr. med. W. Kühn, Gutachter 1, bewertete 14 der 50 Pap-Abstriche mit Pap II, zwei mit Pap III, 30 mit Pap IIIId und drei mit Pap IVa. Ein Abstrich konnte nicht beurteilt werden. Die zweite Gutachterin, Frau Dr. med. H. Perlitz, bewertete 29 Pap-Abstriche mit Pap II, vier mit Pap III, 13 mit Pap IIIId und drei mit Pap IVa bzw. IVb. Ein Abstrich konnte nicht beurteilt werden. Herr PD Dr. med. H. Ikenberg beurteilte als dritter Gutachter 32 Pap-Abstriche mit Pap II, 16 mit Pap IIIId und zwei mit Pap IVa.

14 der 38 Pap IIIId Befunde wurden durch mindestens zwei von drei Gutachter bestätigt. Acht wurden einstimmig als Pap II Befund evaluiert. 16 Pap IIIId Befunde wurden nur von einem Gutachter erneut als Pap IIIId eingestuft und durch die anderen als Pap II bewertet. In 14 dieser 16 Fälle ist hierbei das Pap IIIId Gutachten durch das Team um Prof. Dr. med. Kühn erfolgt.

Von 13 Pap IVa Befunden wurden fünf zumindest teilweise durch die Gutachter bestätigt. Drei konnten nicht erneut evaluiert werden, da keine Zytologie mehr vorhanden war. Drei Weitere wurden mit Pap IIIId bewertet. In zwei Fällen wurde der Pap IVa Befund durch alle Gutachter auf Pap II herunter gestuft.

Ergebnisse

Tab. 18: HPV-negative Proben mit zytologischer Reevaluation

Probennr.	Pap Charité ^{a)}	CIN Charité ^{a)}	Pap G1 ^{b)}	Pap G2 ^{b)}	Pap G3 ^{b)}
10-0396	IIIId	II	II	II 3-4	II
10-0399	IIIId	c)	IIIId	III 3	IIIId
10-0408	IIIId	c)	II	II 3-4	II
10-0419	IIIId	I	IIIId LSIL	II 3	II
10-0564	IIIId	c)	IIIId	n. b.	IIIId
10-0566	IIIId	I	IIIId LSIL	II 3-2	II k
10-0726	IIIId	c)	IIIId	II 3	II
10-0744	IIIId	c)	II	IIIId 3	IIIId
10-0781	IIIId	c)	II	IIIId	II
10-0848	IVa	k. H.	II	II 3-4	II
10-0860	IIIId	k. H.	IIIId	II 2-3	II
10-0862	IIIId	k. H.	IIIId	II 3-4	II
10-0920	IIIId	k. H.	II	II 4-3	II
10-1111	IIIId	c)	IIIId	IIIId 3	IIIId
10-1112	IIIId	c)	IIIId	II 3	II
10-1165	IIIId	c)	IIIId	II 3-4	II
10-1167	IIIId	c)	IIIId LSIL	II 3-4	II k
11-0028	IIIId	k. H.	IIIId	II 3	II
11-0040	IIIId	c)	II	II 3-4	II k
11-0053	IIIId	c)	IIIId	IIIId	IIIId
11-0092	II-IVa	I-III	II	II 4-3	II
11-0139	IIIId	k. H.	IIIId LSIL	IIIId 3	II
11-0170	IIIId	k. H.	IIIId	II 3-4	IIIId
11-0329	c)	II	III	III	II

a) ursprüngliche Pap- bzw. CIN- Befunde der Charité; b) Pap-Befund von Gutachter 1, 2, 3; c) kein CIN- bzw. Pap-Befund vorliegend.

Zahlen hinter Pap-Befunden = Proliferationsgrad & Auskunft über Beschaffenheit von Zervixschleimhaut und Hormonhaushalt (nach (45)); n. b. = nicht beurteilbar; k = Kontrolle; LSIL, HSIL = low- bzw. high-grade intraepithelial lesion; Probennr. = Probennummer; k. H. = kein Hinweis auf histologische Atypie.

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

In 30 der 57 zunächst HPV-negativen Proben wurde durch Untersuchungen in Jena und Heidelberg HPV nachgewiesen. Schließt man die durch das Multimetrix-Kit in Berlin positiv getesteten Proben ein, wurde in 132 von 160 Proben HPV bei der Reevaluation gefunden. Eine Probe wurde aufgrund unzureichenden Materials ausgeschlossen. 27 Proben blieben HPV-negativ. Nachfolgend werden die HPV-Ergebnisse gemeinsam mit den zytologischen und histologischen Befunden erläutert.

Von den zwölf Pap-Abstrichen mit einheitlichem Gutachterergebnis Pap II oder III wurden fünf Proben in Jena oder Heidelberg positiv und sieben negativ für HPV getestet. Zwei Proben waren HPV-negativ ohne Hinweis auf eine CIN. Drei waren HPV-negativ mit CIN II bzw. CIN III. Zu zwei HPV-negativen Proben lag kein histologischer Befund vor. Bei den HPV-positiven Proben lag dreimal ein pathologischer, zweimal kein histologischer Befund vor.

Ursprünglich gab es 38 Pap IIIId Befunde, von denen acht einstimmig als Pap II Befunde reevaluiert wurden. Von diesen acht wiesen drei eine pathologische Histologie auf und vier waren HPV-positiv. Mindestens zwei von drei Gutachtern werteten 14 der Pap IIIId Befunde erneut als Pap IIIId, hiervon waren sieben positiv für HPV, wovon vier wiederum eine pathologische Histologie aufzeigten. Die 16 übrigen Pap IIIId Befunde wurden nur von einem Gutachter erneut als Pap IIIId und durch die anderen als Pap II gewertet. Hierunter waren zwei Befunde einer CIN I, beide negativ für HPV, und ein CIN III Befund, positiv für HPV. Insgesamt waren sechs dieser 16 Proben durch die Labore in Jena oder Heidelberg HPV-positiv getestet worden.

Von ursprünglich 13 Pap IVa Befunden konnten drei nicht erneut evaluiert werden, der ursprüngliche histologische Befund von CIN III und die nun positiven HPV-Befunde passen jedoch zum ursprünglichen Pap IVa Befund. Für zwei Pap IVa Befunde wurde dieses Ergebnis durch mindestens zwei Gutachter bestätigt, beide Proben dazu waren HPV-positiv und für einen Befund lag ein CIS vor. Drei Pap IVa Befunde wurden nur von einem Gutachter erneut so bewertet, sie waren zusätzlich HPV-positiv, zwei wiesen eine CIN III auf, der andere eine VAIN III. Drei Weitere wurden auf Pap IIIId herunter gestuft, auch hier wurde HPV nachgewiesen. Einer von ihnen hatte zusätzlich eine CIN I. In den zwei durch alle Gutachter auf Pap II herunter gestuften Fällen konnte auch kein HPV nachgewiesen werden. Für einen der beiden Fälle war im System ein sehr widersprüchlicher Befund von Pap II-IVa und CIN I-III eingetragen, so dass es sich hierbei möglicherweise um einen Fehler in der Dateneingabe handelte. Zu dem anderen Befund lag kein Hinweis auf eine CIN vor.

Folgende HPV-Typen wurden in den 30 nun HPV-positiven Proben in Jena und Heidelberg bestimmt:

Unbestimmt: HPV 30 (3 x), 55 (2 x), 62 (2 x), 67 (3 x), 87 (1 x), 91 (5 x)

LR-HPV: HPV 11 (1 x), 42 (1 x), 43 (1 x), 44 (1 x), 61 (1 x), 70 (1 x)

Mögl. HR-HPV: HPV 53 (2 x), 66 (1 x), 68a (1 x), 82 (1 x)

HR-HPV: HPV 16 (2 x), 31 (6 x), 33 (4 x), 45 (2 x), 51 (3 x), 52 (2 x), 58 (2 x)

Tabelle 19 stellt die HPV-Ergebnisse der E7-Multiplex-Analyse aus Jena, die Ergebnisse inkl. der seltenen HPV-Typen aus Heidelberg, die zytologischen Reviews sowie die ursprünglichen histologischen und zytologischen Befunde der Charité dar.

Ergebnisse

Tab. 19: Ergebnisse aus HPV-Analysen und zytologischer Reevaluation

Probennr.	E7-Multiplex	HPV, inkl. seltene Typen	HPV Charité ^{a)}	Pap Charité ^{a)}	CIN Charité ^{a)}	Pap G1 ^{b)}	Pap G2 ^{b)}	Pap G3 ^{b)}
10-0396	0	0	0	III d	II	II	II 3-4	II
10-0399	0	0	0	III d	c)	III d	III 3	III d
10-0408	0	0	0	III d	c)	II	II 3-4	II
10-0419	0	0	0	III d	I	III d LSIL	II 3	II
10-0480	0	82	0	III d	I	II	II 3	II k
10-0513	0	11, 45, 51, 53	0	III d	III	III d LSIL	II 3-4	II
10-0557	0	91	0	III d	I	III d	III 3	III d
10-0564	0	0	0	III d	c)	III d	n. b.	III d
10-0566	0	-	0	III d	I	III d LSIL	II 3-2	II k
10-0592	45	33	0	III d	c)	III d	II 3-4	III d
10-0595	31	31	0	III d	I	III d	III 3	III d
10-0654	0	67	fragl. 16	IV a	c)	III d HSIL	II 3	III d
10-0701	0	33	fragl. 33	IV a	CIS	IV a	IV a	IV a
10-0707	31	31, 43, 55, 62	0	III d	II	II	II 3	II
10-0709	31	61	fragl. 16	II	II	II	II 3-4	II
10-0726	0	0	0	III d	c)	III d	II 3	II
10-0731	0	30	0	III d	c)	III d LSIL	II 3	II k
10-0744	0	0	0	III d	c)	II	III d 3	III d
10-0768	58	42, 58	0	III d	c)	III d	II 3	II
10-0781	0	0	0	III d	c)	II	III d	II
10-0782	0	33	0	III d	c)	II	II 3	II
10-0796	0	30, 62	0	III d	II	III d	III d	II
10-0848	0	0	0	IV a	k. H.	II	II 3-4	II
10-0860	0	0	0	III d	k. H.	III d	II 2-3	II
10-0862	0	0	0	III d	k. H.	III d	II 3-4	II
10-0920	0	0	0	III d	k. H.	II	II 4-3	II
10-1026	0	30	0	IV a	c)	III d LSIL	III d	III d
10-1044	0	0	0	c)	Adeno-Ca. vag.	c)	c)	c)
10-1102	0	53	0	IV a	I-III	IV a	III d	III d
10-1111	0	0	0	III d	c)	III d	III d 3	III d
10-1112	0	0	0	III d	c)	III d	II 3	II
10-1120	33	33	0	IV a	c)	III	IV b	IV a
10-1165	0	0	0	III d	c)	III d	II 3-4	II
10-1167	0	0	0	III d	c)	III d LSIL	II 3-4	II k
11-0028	0	0	0	III d	k. H.	III d	II 3	II
11-0040	0	0	0	III d	c)	II	II 3-4	II k
11-0053	0	0	0	III d	c)	III d	III d	III d
11-0090	0	66, 68a	0	III d	I-II	III d LSIL	III d	II k
11-0092	0	0	0	II-IV a	I-III	II	II 4-3	II
11-0137	31	31	0	III d	c)	III d	III d	III d
11-0139	0	0	0	III d	k. H.	III d LSIL	III d 3	II
11-0170	0	0	0	III d	k. H.	III d	II 3-4	III d
11-0192	58	58	0	IV a	III	c)	c)	c)
11-0217	0	55, 91	0	III d	c)	III d HSIL	III d	III d
11-0219	52	0	0	III d	c)	II	II 3	III d
11-0235	0	44, 91	0	IV a	VAIN III	IV a	III d	III d
11-0236	-	91	0	III d	c)	II	II 3	II
11-0241	31	31, 67, 91	0	IV a	III	n. b.	IV a	II
11-0260	0	51	0	III d	c)	III d	II 3	II k
11-0290	0	51, 87	0	IV a	I	III d	III	II
11-0296	16	16	0	IV a	III	c)	c)	c)
11-0297	31	31, 67, 70	0	IV a	III-CIS	c)	c)	c)
11-0319	0	52	0	III d	c)	III d	II 3-4	II k
11-0329	0	0	0	c)	II	III	III	II
IMD10-0332	0	0	0	c)	I-II	c)	c)	c)
IMD10-1909	16	-	0	c)	I	c)	c)	c)
IMD11-0446	0	-	0	c)	I	c)	c)	c)

a) ursprüngliche HPV-, Pap- bzw. CIN- Befunde der Charité; b) Pap-Befund von Gutachter 1, 2, 3; c) kein CIN- bzw. Pap-Befund vorliegend.

0 = HPV-negativ; - = β -Globin negativ bzw. kein DNA-Nachweis; k. H. = kein Hinweis auf eine histologische Atypie; inkl. = inklusive; fragl. = fraglich; n. b. = nicht beurteilbar; Probennr. = Probennummer; Zahlen hinter Pap-Befunden geben Proliferationsgrad und Auskunft über die Beschaffenheit von Zervixschleimhaut und Hormonhaushalt an (nach (45)); k = Kontrolle; LSIL, HSIL = low- bzw. high-grade intraepithelial lesion; Adeno-Ca. vag. = Adenokarzinom der Vagina; CIS = Carcinoma in situ; VAIN = vaginale intraepitheliale Neoplasie.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es zur Qualitätskontrolle eines genotypisierenden HPV-Tests, der in der klinischen Routine eingesetzt wird, diskrepante Befunde HPV-negativ getesteter Patientinnen mit pathologischer Zytologie und/oder Histologie erneut zu untersuchen und gegebenenfalls aufzuklären. Dafür wurden unterschiedliche Testverfahren zur HPV-Detektion genutzt und es fand eine erneute zytologische Evaluation mit Hilfe von drei unabhängigen Gutachtern statt. Die Ergebnisse werden im Folgenden unter Berücksichtigung aktueller Literatur diskutiert, Testmethoden einander gegenüber gestellt und Fehlerquellen erörtert.

5.1 Qualitätssicherung der Testmethoden

Zur Sicherung der Qualität der Testmethoden sind neben dem eigentlichen Probenmaterial einige Kontrollen eingesetzt worden. Dazu zählen die Primer zur Amplifizierung von β -Globin, die Positivkontrolle mit dem HPV-Mix, die Negativkontrolle und die Hybridisierungskontrolle. Zur Überprüfung der Übereinstimmung der Proben, welche in Labore nach Jena und Heidelberg verschickt wurden, dienten zusätzlich acht HPV-positive Proben aus dem GTI-Labor als Positivkontrollen.

Der β -Globin Primer zielt darauf ab, eine bestimmte Region des β -Globin Gens zu amplifizieren und dient somit als Nachweis des Vorhandenseins menschlicher DNA. Besonders im zweiten, aber auch im ersten Zyklus mit dem Multimetrix-Kit im GTI-Labor, zeigten sich einige Proben negativ für β -Globin. Bei einer Testung dieser negativen Proben in Berlin mit Hilfe einer hochsensitiven PCR und 2 % Agarosegelaufftrennung waren die Proben jedoch positiv für β -Globin. Des Weiteren gab es mit dem Multimetrix-Kit mehrere Proben, die zwar negativ für β -Globin, trotzdem jedoch deutlich positiv für HPV waren. Um β -Globin mit der internen Kontrolle des Multimetrix-Tests nachweisen zu können, müssen mindestens etwa 1.000 menschliche zelluläre Genomäquivalente in der Probe enthalten sein. Es ist also möglich, dass die DNA-Menge unterhalb der Nachweisgrenze für β -Globin im Multimetrix-Test lag. In Fällen, in denen viel HPV-DNA nachgewiesen wurde, die Probe jedoch negativ für β -Globin blieb, kann eine Konkurrenz während der PCR um die Amplifikation von β -Globin und HPV stattgefunden haben (40). Bei negativem β -Globin und gleichzeitig positivem HPV-Befund wird die Probe als HPV-positiv und repräsentativ gewertet. Ist

neben dem β -Globin auch das HPV-Ergebnis negativ, kann keine Aussage zum HPV-Status gemacht werden. In nachfolgenden Studien kann eine zusätzliche single-plex β -Globin-PCR zum DNA-Nachweis angewandt werden, welche getrennt zum HPV-Nachweis abläuft, um eine Konkurrenz während der Amplifikation zu verhindern. Des Weiteren sollte die bei der PCR eingesetzte Probenmenge erhöht werden, um eine bessere Amplifikation der β -Globin-DNA zu gewährleisten.

Die Negativkontrollen blieben während der Messungen im GTI-Labor alle negativ für HPV. Dies spricht gegen eine Kontamination der Proben und des Mastermixes mit HPV-DNA während des Testvorgangs.

Sowohl in der Positivkontrolle im GTI-Labor als auch in den Kontrollen in den Laboren in Jena und Heidelberg wurde HR-HPV nachgewiesen. Die Übereinstimmung der Positivkontrollen von Heidelberg und Berlin waren bis auf die Mischinfektionen sehr gut. In Jena wurde in einer der Proben mit einer Mischinfektion weder HPV 16 noch 45 erkannt. Die HPV-Typen 52 und 58 wurden in Jena in zwei Proben jeweils gegensätzlich zum Ergebnis aus Berlin und Heidelberg entdeckt, so dass es hier möglicherweise in Jena zu einer Verwechslung der Proben gekommen ist.

Dem Multimetrix-Kit ist eine Hybridisierungskontrolle beigefügt, welche sowohl als einzelne Probe angesetzt als auch jeder Probe in angegebener Menge beigemischt wurde. Die Werte der Hybridisierungskontrollen zeigten keine Auffälligkeiten.

5.2 HPV-Testmethoden im Vergleich

Die multiplexen Analysesysteme, welche im Labor in Heidelberg und im GTI-Labor genutzt wurden, benutzen für die Detektion der HPV-DNA generische Primer für das L1 Gen. Im Gegensatz dazu werden bei der E7-Multiplex-Analyse spezifische Primer für das E7 Gen verwendet. Der Unterschied zwischen den multiplexen Analysen und dem GP-5+/6+-PCR-EIA besteht in der Typisierungs- und Quantifizierungsmethode. Während die multiplexen Analysesysteme durch die Bindung von Oligonukleotiden an Beads und die anschließende Messung mit Hilfe des Luminex-Analysators eine Detektion von 100 Oligonukleotidproben gleichzeitig erlauben, sind mehrere Enzymimmunoassays für die Auswertung der gleichen Anzahl von Proben notwendig.

Die multiplexe Genotypisierung scheint einer Studie von Schmitt et al. zufolge außerdem sensitiver als der GP-5+/6+-PCR-EIA (41).

In einer Studie von Schmitz et al., welche den GP-5+/6+-PCR-EIA mit der E7-Multiplex-PCR vergleicht, war der Multiplex-Test geringfügig weniger sensitiv, für die Detektion von Läsionen \geq CIN II dafür jedoch spezifischer (42). Andere Studien, welche durch B. J. Morris verglichen wurden, kamen zu dem Ergebnis, dass typenspezifische Primer für E6 und E7 eine größere Anzahl entsprechender HPV-Infektionen detektierten als Testmethoden mit generellen Primern für L1 und E1. Erst die Nutzung mehrerer unterschiedlicher konsensueller Primer zusammen würde demnach zu einer hohen Detektion von HPV-Infektionen führen. Ein weiterer Vorteil bei der Nutzung von E6 und E7 Primern bestehe darin, dass die Zielsequenzen bei Integration nicht verloren gehen können, wie das bspw. für Zielsequenzen der L1 Primer der Fall ist (31). Ein Nachteil der typenspezifischen Primer besteht darin, dass sie in Testkits meist nur für eine geringe Anzahl von HPV-Typen vorhanden sind. In der vorliegenden Arbeit entspricht das einer Detektion von sieben verschiedenen HPV-Typen für den E7-Multiplex-Test, gegenüber 24 HPV-Typen für das in Berlin genutzte Multimetrix-Kit und 55 HPV-Typen des multiplexen Analysesystems aus Heidelberg mit konsensuellen Primern.

Das Vorgehen in dieser Studie war nicht darauf ausgelegt die drei Testverfahren bezüglich signifikanter Unterschiede in Sensitivität und Spezifität zu vergleichen. Hierzu wäre es nötig alle 160 zu Anfang negativ gebliebenen Proben auf gleiche Weise durch die drei unterschiedlichen Testverfahren zu untersuchen, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Dies könnte Bestand zukünftiger Studien sein, um die Testmethoden weiter zu optimieren.

Der Ansatz zur Detektion seltenerer HPV-Typen zeigt die Wichtigkeit der Erforschung unbekannter HPV-Typen. Innerhalb der letzten Jahre konnten von 2004 bis zum Jahr 2010 28 neue HPV-Typen klassifiziert werden (3). Ein Testverfahren, welches auch seltenerer HPV-Typen einbezieht und dennoch erschwinglich für Screeninguntersuchungen bleibt, wäre wünschenswert. Dies würde die Forschung bezüglich der Einteilung in HR- und LR-HPV-Typen vorantreiben und sich dadurch positiv auf die Prognostik auswirken.

5.3 Ergebnisse und Grenzen der HPV-Testmethoden

Von den 160 Proben, die zu Anfang der Studie HPV-negativ waren, obwohl sie eine pathologische Zytologie oder Histologie aufwiesen, konnten durch eine wiederholte Untersuchung mit dem Multimetrix-Kit in der Charité 102 HPV-positive (damit ursprünglich falsch-negative) Proben herausgefiltert werden, dies entspricht 63,75 %. 57 restliche Proben wurden in Laboren in Jena und Heidelberg durch unterschiedliche Testverfahren erneut evaluiert, 27 bleiben bis zum Schluss HPV-negativ (16,88 %). Eine Probe konnte aufgrund von zu wenig Material nicht in Jena und Heidelberg reevaluiert werden. Von prognostischer Relevanz ist zu erwähnen, dass 79 der 160 zu Studienbeginn negativ gebliebenen Proben (49 %) einen zytologisch oder histologisch schweren pathologischen Befund aufwiesen (> Pap III, CIN III, VAIN III, Adenokarzinom zervikal oder vaginal). Dies entspricht 6,3 % der 1.254 untersuchten Patientinnendaten. Hiervon wurde in allen bis auf zwei Proben letztlich HPV gefunden. Wie die Tabellen 10 und 12 zeigen, handelte es sich in diesem Zusammenhang auch um HPV-Typen, die bereits ursprünglich hätten erkannt werden müssen. Beispielsweise wurde in den beiden Multimetrix-Kit Zyklen in Berlin insgesamt 33-mal eine HPV 16 und 12-mal eine HPV 33 Infektion nachgewiesen. Die beiden Proben, die bis zum Schluss negativ für HPV blieben, wurden durch alle drei zytologischen Gutachter auf Pap II heruntergestuft. Durch die aktuelle Arbeit konnte somit ein Defizit der GP-5+/6+-PCR des GTI-Labors aufgedeckt werden, welches im Anschluss behoben wurde (nicht Teil dieser Arbeit).

Es ist festzuhalten, dass in Heidelberg auf insgesamt 55 HPV-Typen getestet wurde, also ein wesentlich größeres Spektrum als in Jena und Berlin. 17 der in Heidelberg gefundenen HPV-Infektionen konnten durch das Multimetrix-Kit in Berlin nicht entdeckt werden, da die HPV-Typen nicht im Kit eingeschlossen waren. Hierbei handelte es sich um Infektionen mit den HPV-Typen 30, 55, 62, 67, 87, 91 und 61. HPV 61 gehört in die Kategorie der LR-HPV, die anderen sind bisher keiner Kategorie zugeordnet. HPV 91 wurde als Mischinfektion in einem Fall mit LR-HPV 44, in einem anderen mit HPV 31 und 67 in Pap IVa Befunden gefunden, so dass hier genauer zu untersuchen ist, ob der HPV-Typ 91 nicht auch den möglicherweise HR-HPV zugeordnet werden kann. Auch der HPV-Typ 67 wurde in drei Fällen in einem Pap IVa Befund nachgewiesen, einmal als Mischinfektion mit HPV 31 und 70 und einmal mit HPV 31 und 91, einmal jedoch

auch als alleiniger HPV-Typ. HPV 67 wird nur in einer geringen Anzahl von Karzinomen gefunden, ist jedoch der einzige HPV-Typ der $\alpha 9$ Spezies, der bisher nicht als karzinogen eingestuft wurde (2). Die Datenlage zu HPV 91 ist noch geringer, er wird jedoch eher mit Genitalwarzen assoziiert (46; 47). Somit wären nähere Untersuchungen bezüglich ihrer Karzinogenität nützlich.

In den 57 Proben, die in Jena und Heidelberg nachuntersucht wurden, hätten 32 HPV-Infektionen durch das Multimetrix-Kit und auch bei den vorangegangenen Screeninguntersuchungen mit Hilfe der GP-5+/6+-PCR in der Charité erkannt werden müssen. Hierbei handelte es sich sechsmal um eine LR-HPV-Infektion, fünfmal um eine möglicherweise HR-HPV-Infektion und 21-mal um eine HR-HPV-Infektion. Insbesondere der HR-HPV-Typ 31 wurde sechsmal nicht erkannt, gefolgt von den HR-HPV-Typen 33 (4 x), HPV 51 (3 x) und HPV 16, 45, 52 und 58 (je 2 x). Die Testmethoden aus Jena und Heidelberg zeigten beim HPV-Typ 31 und 58 eine gute Übereinstimmung, in fünf von sechs Fällen fanden beide die HPV 31 Infektion und in beiden Fällen die HPV 58 Infektion. Für die Detektion von HPV 31 gab es demnach im GTI-Labor ein Sensitivitätsproblem, welches erkannt und dadurch behoben werden konnte. Die HPV 33 Infektion wurde in Jena nur einmal, in Heidelberg hingegen viermal gefunden. In den Proben 10-0701 und 10-7082 wurde der HPV-Typ 33 ausschließlich in Heidelberg gefunden. In der Probe 10-0701 mit niedriger, in 10-0782 mit hoher Viruslast. Für die sieben durch den E7-Multiplex-Test zu entdeckenden HPV-Typen wird die geringste Sensitivität für HPV 18 und 33 angegeben, womit sich die Abweichungen erklären ließen (42). HPV 16 fand man in Jena zweimal, in Heidelberg hingegen nur einmal, wobei die Probe, in der ein zweites Mal HPV 16 in Jena gefunden wurde, in Heidelberg nicht genügend DNA aufwies. Die HPV-Infektionen mit den Typen 45 und 52 wurden durch beide Tests jeweils einmal in unterschiedlichen Proben gefunden. Die beiden HPV 45 positiven Proben werden im Abschnitt der HPV-Mischinfektionen erörtert. Die HPV 52 Infektion der Probe 11-0219 wird im Folgenden bei der HPV-Integration thematisiert. Die Probe 11-319 war nur in Heidelberg HPV 52 positiv, allerdings mit einer geringen Viruslast, was den Grund für den negativen Test in Jena und Berlin darstellen könnte. Insbesondere die unentdeckten 21 HR-HPV-Infektionen stellen ein großes Problem dar. Die 21 Infektionen verteilen sich auf 19 Patientinnen, von denen neun mindestens eine Diagnose von Pap IVa oder einer CIN II hatten. Bei

zwei dieser neun Patientinnen wurde sogar ein Carcinoma in situ festgestellt. Trotz der zunächst negativen HPV-Befunde wurden 12 von 15 Patientinnen aufgrund des histologischen oder zytologischen Untersuchungsbefundes von größer als Pap III d bzw. mit CIN III oder Adenokarzinom der Vagina therapiert. Für drei der Patientinnen gibt es keine weiteren Angaben zur Therapie. Dies betrifft die Patientinnen mit der Nummer 10-0513, 10-0848 und 10-1026. Meist erfolgte die Therapie in Form einer Abrasio und Konisation. Dieses Vorgehen traf zum Beispiel auch für die Patientin 11-0092 zu, bei der bis zuletzt kein HPV nachweisbar war. Die Patientin 10-1120, bei der im Rahmen der Nachuntersuchung dieser Arbeit HPV 33 gefunden wurde, wurde letztlich aufgrund eines Carcinoma in situ Befundes hysterektomiert. Eine Kombination aus HPV-Test und Zytologie bzw. Histologie war in diesen Fällen also unabdingbar, um das Fortschreiten der Erkrankung zu entdecken bzw. zu therapieren.

5.4 HPV-Mischinfektionen

Unterschiedliche Testergebnisse finden sich besonders häufig in Proben mit multiplen Infektionen (42; 48). Dies liegt unter anderem daran, dass bestimmte HPV-Typen Kreuzreaktionen hervorrufen und mit Primern reagieren, die eigentlich zur Detektion anderer HPV-Typen bestimmt sind. Dies betrifft beim GP-5+/6+-PCR-EIA beispielsweise die HPV-Typen 33 und 58 bzw. 45 und 18 (42). Beim Multimetrix-Kit können Kreuzreaktionen zwischen dem PCR-Produkt von HPV 51 und der Sonde für HPV 82 bzw. dem PCR-Produkt von HPV 66 und 56 und der Sonde für HPV 16 und zwischen dem PCR-Produkt von HPV 33 und der Sonde für HPV 59 auftreten (40). In der Probe 10-0513 wurde in Heidelberg eine Mischinfektion aus HPV 11, 45, 51 und 53 gefunden. In dieser hätte in Jena HPV 45 gefunden werden müssen. Allerdings lag nur eine geringe Viruslast vor, die zur Detektion möglicherweise nicht ausreichte. Die Probe 10-0592 erwies sich in Jena positiv für HPV 45, in Heidelberg hingegen für HPV 33. Hier könnte eine unentdeckte Mischinfektion vorliegen.

5.5 Pap-Abstrich und HPV-Test als Screeninguntersuchung

Es kann festgehalten werden, dass selbst innerhalb einer so geringen Anzahl von Proben Unterschiede bezüglich der HPV-Detektion auftreten. Dies kann zum einen an der Sensitivität der Testmethoden selbst liegen. Es ist jedoch auch nicht von der Hand zu weisen, dass die Qualität und Beurteilung des Pap-Befundes abhängig von der

Entnahme, Verarbeitung und Untersuchung ist (22; 34). Es wird nur eine sehr geringe Menge Abstrichmaterial entnommen. Geschieht dies nicht an der richtigen Stelle, kann es sein, dass das Ausmaß einer Läsion verkannt bzw. die HPV-Infektion verpasst wird. Es gelangt nur ein geringer Teil von Zellen des Abstrichmaterials zur DNA-Isolation, hiervon wiederum nur ein geringer Teil zur spezifischen HPV-DNA-Detektion. Liegt also nur eine geringe Anzahl von HPV-DNA-Kopien vor, so werden diese in der für die PCR entnommenen Probenmenge möglicherweise nicht jedes Mal erfasst. Hierdurch kann es zu den unterschiedlichen Ergebnissen der Testverfahren kommen (29). Um dem entgegen zu wirken, könnte eine größere Menge an DNA-Probenmaterial für die PCR verwendet werden.

Im Anschluss an einen auffälligen zytologischen Befund sollen die in der Kolposkopie genutzten Färbemethoden mit Essigsäure oder Jodlösung die Entnahme von Probenmaterial für eine Biopsie und dadurch die sich anschließende histologische Untersuchung verbessern. Die histologische Untersuchung gilt als Goldstandard der Diagnostik zur Abklärung abnormer zytologischer Befunde. Da ein Großteil der reevaluierten Proben von Patientinnen stammt, die zur Screening-Untersuchung zunächst nur einen Pap-Abstrich erhalten hatten, liegt zu vielen Proben kein histologisches Untersuchungsergebnis vor. Der derzeitige Standard des Screenings ist die alleinige Zytologie, weshalb auch Fälle ohne histologische Verifikation eingeschlossen wurden. Um die Ergebnisse weiter zu spezifizieren, könnten in folgenden Arbeiten ausschließlich Patientinnen eingeschlossen werden, die aufgrund diagnostischer oder therapeutischer Maßnahmen sowohl ein histologisches als auch ein zytologisches Untersuchungsergebnis vorweisen.

Die Interpretationen der Pap-Abstriche durch die drei unterschiedlichen Gutachter ergaben nur in 18 der 50 Fälle (36 %) ein einheitliches Ergebnis. Hierbei unterschieden sie sich wiederum in elf Fällen vom ursprünglichen Pap-Befund der Charité. Daraus folgt, dass nur sieben von 50 Befunden (14 %) durch alle vier beteiligten Zytologen gleich bewertet wurden. Im Beispiel der 16 Pap IIIId Befunde, die durch zwei von drei Gutachter zu Pap II Befunden herunter gestuft wurden, kam das Gutachten, welches weiterhin einen Pap IIIId Befund vorsah, 14-mal vom Team um Prof. Dr. med. Kühn. Die Bewertung eines Pap-Abstrichs zu Pap II oder Pap IIIId hat Auswirkungen auf den Abstand der Kontrollintervalle. Da allen das identische Präparat vorlag, kann davon

ausgegangen werden, dass einige Zytologen zu schwerwiegenderen Befunden tendieren, wodurch das Kontrollintervall durch den Arzt verkürzt werden kann.

Des Weiteren hängt die Beurteilung der Präparate von der Erfahrung des Zytologen und der Qualität der Pap-Abstriche auf dem Objektträger ab. In den Bemerkungen zu den reevaluierten Abstrichen wurden einige Präparate als schwer zu beurteilen eingestuft. Dies lag zum Beispiel daran, dass nicht genug Material auf dem Objektträger vorhanden war oder eine mangelhafte Färbung und Fixierung vorlag. Ungenauigkeiten in der Durchführung und Auswertung der Pap-Abstriche tragen mit dazu bei, dass die Sensitivität des Pap-Tests oft geringer ist als die der HPV-Diagnostik, so dass zu überlegen ist die beiden Testverfahren grundsätzlich in Kombination anzubieten (34). Hierdurch kann Mayrand et al. zufolge eine Sensitivität von etwa 100 % und eine Spezifität von 92,5 % für die Detektion von CIN II und III erreicht werden (32).

Mittendorf et al. untersuchten in ihrem Bericht zur HPV-Diagnostik und Zervixkarzinomfrüherkennung insgesamt 26 Studien zum Thema der medizinischen und ökonomischen Relevanz der Kombination von Pap-Abstrich und HPV-Test. 25 von 26 Studien kamen hierbei zu dem Ergebnis, dass der HPV-Test die sensitivere Methode zur Detektion von \geq CIN II sei, jedoch hatte er gleichzeitig in 21 von 26 Studien eine niedrigere Spezifität. Eine Kombination der Tests würde somit die Rate falsch-negativer zytologischer Testergebnisse reduzieren, kann gleichzeitig jedoch zu einer Erhöhung der falsch-positiven Werte führen. Eine genaue Aufklärung der Patientinnen bezüglich ihres persönlichen Karzinomrisikos insbesondere bei einem positiven HPV-Test ist somit notwendig, um diesbezügliche psychologische Belastungen zu vermeiden. Der Bericht kommt zu dem Schluss, dass eine Kombination der Testverfahren als Screeninguntersuchung stattfinden sollte, die Art der Durchführung jedoch besonders in Bezug auf das Intervall und den Altersbereich näher untersucht werden muss (34).

Eine Kombination von Pap-Abstrich und HPV-Test ist außerdem sinnvoll, um zwischen Erstinfektionen, persistierenden Infektionen und Neuinfektionen unterscheiden zu können. So kann es vorkommen, dass eine Patientin aufgrund einer schweren Dysplasie und einem positiven HPV-Test eine Konisation erfährt. Sollte diese Patientin im Anschluss an die Konisation wieder HPV-positiv getestet werden, kann eine persistierende Infektion vorliegen, was auf eine Konisation non in sano hinweisen

würde. Es kann aber auch zu einer neuen Infektion mit einem anderen HPV-Typen gekommen sein. Da auf dieser Grundlage zwei unterschiedliche Behandlungsansätze beruhen, ist es sinnvoll den HPV-Typen in Kombination mit dem zytologischen und histologischen Befund zu betrachten. Voraussetzung hierfür ist aber die Verwendung eines individuell genotypisierenden HPV-Tests.

Um die Teilnahme an Screeninguntersuchungen zu erhöhen, kann über die Einführung eines Selbstabnahmetests zur Probengewinnung für die HPV-Testung diskutiert werden. Hiermit würden auch Frauen in die Früherkennungsmaßnahmen eingeschlossen werden, die aus welchen Gründen auch immer bei der jährlichen Vorsorgeuntersuchung beim Gynäkologen nicht vorstellig werden (34). Eine in diesem Kontext angefertigte Dissertation von Vartazarova kommt zu dem Schluss, dass die HPV-Genotypisierung aus dem Material selbstdurchgeführter vaginaler Spülungen zu vergleichbar guten Ergebnissen führt, wie die HPV-Genotypisierung aus dem Abstrichmaterial durch den Gynäkologen (49).

Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit wäre es wichtig gewesen, zu jedem zytologischen auch einen histologischen Befund vorliegen zu haben und umgekehrt. Dadurch würde es gelingen die Pathologie der Abstriche noch besser einzuordnen.

5.6 Integration des HPV-Genoms in die Wirts-DNA

Je schwerer die zervikale Läsion, desto häufiger kommt es zur Integration der viralen in die Wirts-DNA. Bestimmte HPV-Typen neigen hierbei mehr zur Integration als andere. Vinokurova et al. untersuchten die Häufigkeit der Integration in Abhängigkeit vom HPV-Typ und dem Stadium der Läsion und kamen zu dem Schluss, dass HPV 16, 18 und 45 im Gegensatz zu HPV 31 und 33 besonders häufig in integrierter Form vorliegen (50).

Die Integration kann dazu führen, dass bestimmte Genabschnitte, am häufigsten Regionen von E1 und E2, aber auch von L1 und L2, verloren gehen. Es kann auch zu einer Mutation oder Unterdrückung der Transkription von L1 in schweren Dysplasien und Karzinomen kommen. Ein damit in Zusammenhang stehendes Problem der Detektion integrierter HPV besteht darin, dass die Primer in den Screeningkits für E1, E2, L1 und L2 meist nur eine bestimmte Basenpaarlänge des Genoms abdecken. Findet der Bruch für die notwendige Integration in die Wirts-DNA nicht innerhalb dieses

Abschnitts statt, so können die Kits HPV detektieren, auch wenn die DNA bereits ausschließlich in integrierter Form vorliegt. Wenn der Bruch allerdings genau in dieser Region stattfindet, kann HPV durch die PCR mit diesen Primern nicht mehr detektiert werden. Abschnitte der E6 und E7 Region sind HPV-typenspezifischer und gehen während der Integration nicht verloren, ohne dass das Virus damit seine Onkogenität verliert. Der Einsatz von E6 und E7 Primern ist daher sensitiver. Ansonsten kann der Einsatz mehrerer Primer, die einzeln unterschiedliche Genomabschnitte zusammen aber zum Beispiel das gesamte L1 Genom abdecken, diesem Problem entgegen wirken (31).

Bei einer Probe (10-0709), welche durch das E7-Multiplex-Kit positiv auf HPV 31, im GP-5+/6+-PCR-EIA jedoch negativ getestet wurde, könnte das HPV-Genom somit in ausschließlich integrierter Form vorliegen. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da HPV 31 selbst im Zervixkarzinom nur in 14 % und in einer CIN III in 10 % der Fälle integriert vorliegt (50). Die Histologie dieser Probe ergab jedoch eine CIN II und es lag ein Pap II Befund vor. In Heidelberg wurde diese Probe ausschließlich HPV 61 positiv getestet, welcher zu den LR-HPV-Typen zählt. Zwei weitere Proben waren im E7-Multiplex-Kit positiv für HPV 52, was sich im GP-5+/6+-PCR-EIA nicht bestätigte. Laut der Mitarbeiter in Jena sei dies jedoch ein Sensitivitätsproblem des GP-5+/6+-PCR-EIA und deute nicht auf eine Integration hin. Eine der Proben (11-0219) ist auch in Heidelberg HPV-negativ geblieben, was doch auf eine Integration hinweisen könnte. Bei der anderen Probe handelte es sich um eine Positivkontrolle, die in Heidelberg und Berlin zuvor positiv für HPV 58 gewesen ist. Cheung et al. beschäftigen sich in einer Studie mit der Integration von HPV 52 und kamen zum Ergebnis, dass Viruslast und Integrationsfrequenz mit der Schwere der Dysplasie ansteigen. Demnach lag in 62,5 % der Fälle von normalen oder CIN I Befunden das Virus in ausschließlich episomaler und zu 20,8 % nur in integrierter Form vor. Für CIN II Befunde betrug die episomale Form 55 %, die Integrierte 10 %, für CIN III waren es 44,4 % bzw. 7,4 % und beim invasiven Karzinom lag das Genom schließlich nur zu 10 % in ausschließlich episomaler und zu 25 % in ausschließlich integrierter Form vor. Die restlichen Befunde waren eine Kombination aus episomaler und integrierter Form (51). Bei der Probe 11-0219 handelt es sich um einen Pap II-IIIa Befund, was der Wahrscheinlichkeit nach eher nicht für eine Integration spricht, sie jedoch auch nicht ausschließt.

Da die Proben in Jena durch die E7-Multiplex-Methode nur im Hinblick auf die sieben häufigsten HPV-Typen untersucht wurden, bestünde ein weiterer Ansatz darin, die Proben auch auf seltenere HPV-Typen in integrierter Form zu untersuchen. Die schweren Dysplasien der bis zum Ende HPV-negativen Proben wurden durch die zytologische Reevaluation jedoch herunter gestuft, was eine Integration von HPV in diesen Fällen unwahrscheinlich macht.

5.7 HPV-Prävalenz bei pathologischer Zytologie und Histologie

Durch die unterschiedlichen Testmethoden konnte in einem Großteil der Proben doch eine HPV-Infektion festgestellt werden. Bei den Proben, die bis zum Schluss HPV-negativ bleiben, handelt es sich, wie in Tabelle 18 gezeigt, zumeist um leichte bis mäßiggradige Dysplasien. Bis auf zwei Pap III d Befunde wurden alle Befunde mindestens durch einen der drei Gutachter herunter gestuft. In unterschiedlichen Studien wurde die Prävalenz von HPV in pathologischen Zytologien und Histologien untersucht. Zum Beispiel gab eine Studie von Andersson et al. die Prävalenz von HR-HPV für CIN I mit 36 %, CIN II mit 63 % und CIN III mit 80 % an (52). Eine Studie von Arbyn et al., die die Pathologien nach dem Bethesda-System einteilte, kam zu folgender HR-HPV-Prävalenz: 11 % in Frauen ohne zytologische Anomalitäten, 77 % in ASC-US, 32 % in AGC, 85 % in LSIL und 93 % in ASC-H und HSIL (53). Klug et al. fanden eine HPV-Prävalenz für Pap I/II von 4,4 %, Pap II w von 10,8 %, Pap III von 21,4 %, Pap III d von 52,5 % und für Pap IV a/b von 100 % (54). In den weiterhin negativen Proben mit höchstens einem Pap III d Befund muss also nicht zwingend eine HPV-Infektion vorliegen.

Die meisten HPV-Infektionen sind selbstlimitierend und heilen im Verlauf aus. Nicht eindeutig geklärt ist allerdings, ob die HPV-Infektion endgültig ausgeheilt ist oder weiterhin als latente Infektion, ähnlich wie beim Herpes Simplex Virus oder Varizella Zoster, vorliegt. Dadurch könnte es möglich sein, dass die Infektion in so geringer Viruslast vorhanden ist, dass sie nicht mehr nachgewiesen werden kann. Einige Studien an HIV-infizierten Patientinnen, die bei erhöhter Immunsuppression HPV-positiv werden, deuten darauf hin (55).

Da die HPV-Prävalenz auch vom Alter und weiteren Risikofaktoren der Patientinnen abhängt, wäre eine Einteilung und Auswertung diesbezüglich von Vorteil. Sie liegt

jedoch für das Patientinnenkollektiv nicht vor. Es sind ausschließlich Informationen bezüglich der Geburtsdaten vorhanden, die für einen Teil der Patientinnen im Folgenden näher erläutert werden:

Von den 27 Patientinnen, welche bis zum Schluss negativ für HPV getestet wurden, waren neun zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 20 und 30 Jahre alt, neun weitere zwischen 31 und 40. Vier Patientinnen waren zwischen 41 und 50 und fünf waren älter als 51 Jahre. Insgesamt 16 Patientinnen waren 36 Jahre oder jünger. In einer Studie von Arbyn et al. zur HR-HPV-Prävalenz in Belgien wird angegeben, dass die Prävalenz im Alter zwischen 20 und 35 Jahren am Höchsten ist, dann stetig abnimmt, um im Alter von etwa 60 Jahren wieder etwas anzusteigen (53). Castle et al. kommen in ihrer Studie über die HPV-Prävalenz in Guanacaste, Costa Rica, zu ähnlichen Ergebnissen. Des Weiteren ist in dieser Altersgruppe die Wahrscheinlichkeit einer Selbstlimitierung der Infektion am Höchsten (56). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, ob und wie lange eine zervikale Dysplasie nach stattgehabter HPV-Infektion bestehen bleibt. Möglicherweise handelt es sich um Patientinnen mit stattgehabter HPV-Infektion und den hiermit morphologisch entsprechenden Dysplasien, bei denen die Viruslast bereits zu gering für einen Nachweis ist. Für eine diesbezügliche Auswertung wären zusätzliche Informationen vorangegangener und Follow-up Untersuchungsergebnisse notwendig.

5.8 Ausblick

Das in der Arbeit reevaluierte Patientinnenkollektiv von 160 Frauen entspricht 12,76 % diskrepanter Fälle im Hinblick auf die 1.254 überprüften Frauen aus der Datenbank der Charité. 27 Patientinnen blieben bis zum Schluss HPV-negativ, eine Probe konnte nicht erneut untersucht werden, 132 Fälle konnten jedoch durch die erneute HPV-Testung aufgeklärt werden, dies entspricht 82,5 %. Durch die zytologischen Gutachter wurden fast alle reevaluierten Pap-Abstriche heruntergestuft, wodurch eine HPV-Negativität plausibler erscheint bzw. von allen Patientinnen mit einem PAP II Befund ursprünglich kein HPV-positives Ergebnis erwartet worden wäre.

Viele Studien zeigten, dass die Detektion von HR-HPV-Infektionen mittels Screeningmethoden wie dem HC2 und dem GP5+/6+-PCR-EIA bessere Ergebnisse in Bezug auf den Nachweis von CIN II, III bzw. CIS Läsionen erbringt, als die Zytologie. Hierzu ist es notwendig, dass Sensitivität und Spezifität der HPV-Tests so abgestimmt

sind, dass nur solche HR-HPV-Infektionen detektiert werden, die auch eine klinische Relevanz mit sich führen. Um das zu erreichen, sollten neue HPV-Tests gewissen Richtlinien und Standards entsprechen, bevor sie in der Klinik routinemäßig genutzt werden. Aufgrund der guten Ergebnisse von HC2 und GP5+/6+-PCR-EIA wurden Daten von mit Hilfe dieser Tests durchgeführten Studien ausgewertet und für die Erstellung von Richtlinien verwendet. Für die Richtlinien von HPV-Tests, welche zum primären Screening verwendet werden sollen, ergab sich nach Meijer et al. Folgendes:

Die Sensitivität zur Detektion von CIN II bis CIS-Läsionen soll mindestens 90 % des HC2 für Frauen älter als 30 Jahre betragen, bei HPV-Negativität lässt sich dann das Screeningintervall strecken; die Spezifität für CIN II bis CIS-Läsionen sollte nicht weniger als 98 % des HC2 für Frauen älter als 30 Jahre betragen; natürlich sollte auch eine ausreichende Reproduzierbarkeit innerhalb des Labors und zwischen unterschiedlichen Laboren bestehen (57).

Bezogen auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist es demnach möglich, dass die benutzten validierten HPV-Tests aufgrund ihrer guten Sensitivität und Spezifität bei einem Großteil der mit Pap II bzw. Pap III d bewerteten Proben nicht reagiert haben, auch wenn vielleicht eine HPV-Infektion mit einer geringen Viruslast vorlag.

Das Ziel des Screenings zur Früherkennung von Zervixkarzinomen besteht darin Dysplasien rechtzeitig zu erkennen und zu behandeln, um dem Zervixkarzinom somit vorzubeugen. Durch die gemeinsame Nutzung von regelmäßigen zytologischen Vorsorgeuntersuchungen und einem Screeningtest für HPV kann eine Sensitivität für höhergradige Dysplasien von bis zu 100 % in Ländern mit gut funktionierendem Vorsorgescreening erreicht werden. Außerdem kann durch die gemeinsame Nutzung über eine kosteneinsparende Anpassung des Vorsorgeintervalls diskutiert werden. Voraussetzung für die Wirksamkeit eines guten Vorsorgeprogramms ist jedoch die Akzeptanz und die regelmäßige Teilnahme durch die entsprechende Bevölkerungsgruppe, welche in Deutschland noch verbessert werden kann (32; 34).

Ein großes Problem stellt das Zervixkarzinom weiterhin für Länder dar, die ihrer Bevölkerung den Zugang zu Vorsorgescreenings nicht ermöglichen können. Da über 80 % der vom Zervixkarzinom betroffenen Frauen aus diesen Ländern stammen, sollte sich die Forschung intensiv um Testverfahren bemühen, die für Entwicklungsländer durchführbar und erschwinglich sind. Des Weiteren muss durch Aufklärung über Risiken

der HPV-Infektion und die Prävention sexuell übertragbarer Krankheiten ein Bewusstsein hierfür geschaffen werden, um die Infektionsrate zu minimieren. Nicht nur die sekundäre Prävention (z. B. gut durchführbare Früherkennungsmaßnahmen), sondern auch die primäre Prävention z. B. in Form der Impfung gegen HPV sollte bewerkstelligt werden, um der Inzidenz des Zervixkarzinoms entgegen zu wirken. Ein Ansatz besteht darin die Zervix der Patientinnen ein- bis zweimal im Leben visuell zu inspizieren und einen HPV-Test durchzuführen. Hierbei sollte das Alter zur Testdurchführung mit etwa 35 bzw. 35 und 40 Jahren gewählt werden. Falls eine HPV-Infektion vorliegt, so ist sie in diesem Alter meist schon persistierend, eine eventuell begleitende zervikale Dysplasie jedoch noch in einem behandelbaren Stadium (16; 58).

6 Literaturverzeichnis

1. **Bzhalavaa D, Eklund C, Dillner J.** International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015;476:341-4.
2. **IARC Working Group.** A Review of Human Carcinogens: Biological Agents: Human Papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012;100 B:255-313.
3. **Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM.** Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology*. 2010;401(1):70-9.
4. **World Health Organization.** Weekly epidemiological record. Position Paper (April 2009). 2009;84(15):117-32.
5. **Zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Rev Cancer*. 2002;2(5):342-50.
6. **Lacey CJ, Lowndes CM, Shakh KV.** Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV 6/11 disease. *Vaccine*. 2006;24S3:S35-41.
7. **Muñoz N, Castellsagué X, Berrington de Gonzalez A, Gissmann L.** Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24S3:3/1-10.
8. **Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.** Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion und präinvasiver Läsionen des weiblichen Genitale (S2). Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). AWMF Leitlinienregister Nr. 015/027. 2008:1-35.
9. **Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Dürst M, Schwarz E.** Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS One*. 2013;8(6):e66693.
10. **IARC Working Group.** Human Papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2007;90:45-179.
11. **World Health Organization.** Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Media Centre. 2013. [Zitat vom: 15. Oktober 2013.] Fact sheet Nr. 380. www.who.int/mediacentre/factsheets/fr380/en/.
12. **Robert Koch Institut und Zentrum für Krebsregisterdaten.** Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2007/2008. 2012;8. Ausgabe.

13. **Douglas R, Schiller JT, Schiller L.** Review Series - Prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(5):1167-73.
14. **Hillemanns P, Kimmig R, Thaler CJ.** Einsatz molekularbiologischer Methoden zu Früherkennung und klinischem Management des Zervixkarzinoms. *Gen-Medizin: eine Bestandsaufnahme; mit 50 Tabellen*. s.l. : Springer, 2001;189-208.
15. **Hillemanns P.** HPV-induzierte zervikale intraepitheliale Neoplasien. *Intraepitheliale Neoplasien: von der Prävention bis zur Nachsorge. Extracta gynaecologica. Beilage*. 2010;3(5):1-8.
16. **Schiffman M, Castle PE.** The Promise of Global Cervical-Cancer Prevention. *The New England Journal of Medicine*. 2005;353(20):2101-4.
17. **Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, Wilander E.** The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *European Journal of Cancer*. 2001;37(2):246-50.
18. **Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV.** Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(11):796-802.
19. **Boardman CH, Matthews Jr KJ.** Cervical Cancer. *Medscape*. [Zitat vom: 18. 10 2013.] Updated 2010/10/15. emedicine.medscape.com/article/253513-overview.
20. **International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, Green J, Peto J, Plummer M, Sweetland S.** Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *International Journal of Cancer*. 2006;118(6):1481-95.
21. **Sinn P.** A73: Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; electronic learning Institute of Pathology Heidelberg. 2012. Letzte Änderung 06/2014. [Zitat vom: 18. 10 2013.] eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/allg/89.
22. **Nocon M, Mittendorf T, Roll S, Greiner W, Willich SN, Graf von der Schulenburg JM.** Welchen medizinischen und gesundheitsökonomischen Nutzen hat die Kolposkopie als primäres Screening auf das Zervixkarzinom? *Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information. Schriftenreihe Health Technology Assessment (HTA) in der Bundesrepublik Deutschland*. 1. Auflage. 2007;57:1-35.

23. **Schneider A.** Gynäkologie Vorlesung - Zervix. 2003. [Zitat vom: 18. 10 2013.] www2.uni-jena.de/ufk/cdvorlesung/folder/start.htm.
24. **Ärzte der Universitätsfrauenklinik Tübingen.** Pap-Tabelle. [Zitat vom: 21. 10 2013.] www.institut-frauengesundheit.org/filadmin/user_upload/pdf/Pap-Tabelle.pfd.
25. **Schneider A, Scheungraber C, Herrmann J.** VI. Jenaer Kolposkopiekurs am 30.04.2004. [CD] Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Klinikum FSU Jena, letzte Änderung 22.05.2002. Einführung in Ätiologie, Epidemiologie, Klinik, Diagnostik, Staging, Therapie, Prognose, Prävention sowie Nachsorge präkanzeröser und invasiver Veränderungen der Cervix uteri.
26. **Frank W, Konta B, Peters-Engl C.** PAP-Test zum Screening auf Zervix-karzinom. Deutsche Agentur für Health Technology Assessment des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information. 1. Auflage. 2005;1-53.
27. **Jenssen C, Beyer T.** 6 Feinnadelaspirations-Zytologie. [Buchverf.] Dietrich CF und Nürnberg D. Interventioneller Ultraschall - Lehrbuch und Atlas für die Interventionelle Sonografie. 1. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 2011;75-98.
28. **Universitätsklinik Jena.** Empfehlungen für Patientinnen zur Behandlung des Gebärmutterhalskrebses und seiner Vorstufen. [Zitat vom: 24. 10 2013.] www2.uni-jena.de/ufk/Zervixinfo/.
29. **Moljin A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ.** Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. Journal of Clinical Virology. 2005;32S1:S43-51.
30. **Arney A, Bennett KM.** Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus. Labmedicine. 2010;41(9):523-30.
31. **Morris BJ.** Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. Clinical Chemical and Laboratory Medicine. 2005;43(11):1171-7.
32. **Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlée F, Franco EL.** Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou Screening Tests for Cervical Cancer. The New England Journal of Medicine. 2007;357(16):1579-88.

33. **Bulkmans NWJ, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, Voorhorst FJ, Verheijen RH, van Groningen K, Boon ME, Ruitinga W, van Ballegooijen M, Snijders PJ, Meijer CJ.** Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *The Lancet*. 2007;370(9601):1764-72.
34. **Mittendorf T, Nocon M, Roll S, Mühlberger N, Sroczynski G, Siebert U, Willich SN, Graf von der Schulenburg JM.** HPV-DNA-Diagnostik zur Zervixkarzinomfrüherkennung. Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information. Schriftenreihe Health Technology Assessment. 1. Auflage, 2007;58:1-134.
35. **Experten der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie.** Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms. Deutsche Krebsgesellschaft e.V.. W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, 2008;1-72.
36. **Pandit-Taskar N, Ma W.** 22 Gynecologic Cancers. [Buchverf.] Strauss HW, Mariani G, Volterrani D, Larson SM. Nuclear Oncology. Springer Science+Business Media New York. 2012;XVI,591-620.
37. **World Health Organization.** Information Sheet. Observed rate of vaccine reactions. Human Papilloma Virus Vaccine. 2012;1-4.
38. **Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM.** Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International Journal of Cancer*. 2007;121(3):621-32.
39. **Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM.** Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2005;14(5):1157-64.
40. **Multimetrix GmbH.** Multiplex HPV Genotyping Kit for Research in Epidemiology [package insert] - siehe Anhang. Heidelberg, 2010. Version 2010-04-14. Cat. Nr. MMLK0124.
41. **Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T.** Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(2):504-12.

42. **Schmitz M, Scheungraber C, Herrmann J, Teller K, Gajda M, Runnebaum IB, Dürst M.** Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *Journal of Clinical Virology*. 2009;44(4):302-7.
43. **Narisawa-Saito M, Kiyono T.** Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Science*. 2007;98(10):1505-11.
44. **Jacobs MV, Snijders PJF, van den Brule AJC, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM.** A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;35(3):791-5.
45. **Heinzeller T, Büsing CM.** 4 Mikroskopische Anatomie und Histopathologie der Organsysteme - Geschlechtsorgane. *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. 2001;231.
46. **Potocnik M, Kocjan B, Seme K, Poljak M.** Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 2007;16(3):91-8.
47. **Schmitt M, de Koning MN, Eekhof JA, Quint WG, Pawlita M.** Evaluation of a Novel Multiplex Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Assay for HPV Types in Skin Warts. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(9):3262-7.
48. **Nindl I, Jacobs M, Walboomers JM, Meijer CJ, Pfister H, Wieland U, Meyer T, Stockfleth E, Klaes R, von Knebel Doeberitz M, Schneider A, Dürst M.** Interlaboratory agreement of different human papillomavirus DNA detection and typing assays in cervical scrapes. *International Journal of Cancer*. 1999;81(4):666-8.
49. **Vartazarova E.** Evaluation eines Selbstabnahmetests für die deutschlandweite HPV-Prävalenzmessung mittels eines innovativen Genotypisierungstests. [Dissertation]. Berlin.2013.
50. **Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseljov F, Dürst M, Schneider A, von Knebel Doeberitz M.** Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Research*. 2008;68(1):307-13.

51. **Cheung JL, Cheung TH, Tang JW, Chan PK.** Increase of integration events and infection loads of human papillomavirus type 52 with lesion severity from low-grade cervical lesion to invasive cancer. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(4):1356-62.
52. **Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B.** Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *British Journal of Cancer*. 2005;92(12):2195-200.
53. **Arbyn M, Benoy I, Simoens C, Bogers J, Beutels P, Depuydt C.** Prevacination distribution of human papillomavirus types in women attending at cervical cancer screening in Belgium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2009;18(1):321-30.
54. **Kluge SJ, Hukelmann M, Hollwitz B, Düzenli N, Schopp B, Petry KU, Iftner T.** Prevalence of human papillomavirus types in women screened by cytology in Germany. *Journal of Medical Virology*. 2007;79(5):616-25.
55. **Wright TC Jr.** Natural History of HPV Infections. *The Journal of Family Practice - Supplement*. 2009;58(9 Suppl HPV):S3-S7.
56. **Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Wacholder S, Tarone R, Burk RD.** A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(11):1808-16.
57. **Meijer CJLM, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ.** Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *International Journal of Cancer*. 2009;124:516-20.
58. **Goldie SJ, Gaffkin L, Goldhaber-Fiebert JD, Gordillo-Tobar A, Levin C, Mahé C, Wright TC.** Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *The New England Journal of Medicine*. 2005;353:2158-68.

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
Abb.	Abbildung
Adeno-Ca.	Adenokarzinom
AGC	Atypical glandular cells of undetermined significance
ASC-H	Atypical Squamous Cells – cannot exclude HSIL
ASC-US	Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance
ATPase	Adenosintriphosphatase
β	beta
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA 125	Cancer-Antigen 125 (Tumormarker)
CBF	Campus Benjamin Franklin der Charité-Universitätsmedizin Berlin
CCM	Campus Mitte der Charité-Universitätsmedizin Berlin
CEA	Carcinoembryonales-Antigen (Tumormarker)
cerv.	zervikal
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CIS	Carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dGTP, dCTP, dTTP - mit Adenosin, Cytidin, Guanosin bzw. Thymidin)
E1, E2, E4, E5, E6, E7	virale nicht-Strukturproteine
et al.	et alii, et aliae - und andere
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
fragl.	fraglich
G1, G2, G3	Gutachter 1, 2, 3
ggf.	gegebenenfalls
GP	general Primer
GP-5+/6+	Primerset für PCR
GP-5+/6+-PCR-EIA	PCR mit GP-5+/6+ Primern und anschließendem Enzymimmunoassay
gr.	grenzwertig

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
GTI-Labor	Labor für gynäkologische Tumorimmunologie am CBF
HC2	Hybrid-Capture 2
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	Humane/s Papillomvirus/en
HR	high-risk, hochrisiko
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesion
IMD	Institut für medizinische Diagnostik
inkl.	inklusive
k	Kontrolle
kb	Kilobase, 1000 Basenpaare
k. H.	kein Hinweis
L1	major capsid protein, virales Strukturprotein 1
L2	minor capsid protein, virales Strukturprotein 2
LCR	long control region, lange Kontrollregion
LR	low-risk, niedrigrisiko
LSIL	low-grade squamous intraepithelial lesion
M	Fernmetastasen
MFI	Mediane Fluoreszenz Intensität
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Min.	Minute/n
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar, Millimol/Liter
modif.	modifiziert
mögl.	möglicherweise
MRT	Magnetresonanztomografie
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
MY09/11	Primerset für PCR
MY-PCR	PCR mit MY09/11 Primerset
N	Lymphknotenstatus

Abkürzungsverzeichnis

n. b.	nicht beurteilbar
nm	Nanometer, 10 ⁻⁹ Meter
Nr.	Nummer
NSE	Neuronenspezifische Enolase (Tumormarker)
p53	Tumorprotein 53
Pap(-Abstrich)	Zervixabstrich nach Papanicolaou
PapSpin	Verfahren zur Dünnschichtzytologie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGMY09/10	Primerset für PCR
pRb	Retinoblastom-Protein
Probennr.	Probennummer
%	Prozent
RNA	Ribonukleinsäure
SCC	Squamous-cell-carcinoma-Antigen (Tumormarker)
Sek.	Sekunde/n
SIL	squamöse intraepitheliale Läsion
SPF10	Primerset für PCR
STIKO	Ständige Impfkommission
SurePath	Verfahren zur Dünnschichtzytologie
T	Tumorgröße / -ausbreitung
Tab.	Tabelle
ThinPrep	Verfahren zur Dünnschichtzytologie
UICC	International Union against Cancer
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V. a.	Verdacht auf
vag.	vaginal
VAIN	vaginale intraepitheliale Neoplasie
w	Wiederholung
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung einiger HPV-Typen bezüglich ihrer Karzinogenität (7)	5
Tab. 2: Beteiligung von HPV-Typen an unterschiedlichen Tumoren (modifi. nach (8)) ...	6
Tab. 3: Funktion von HPV-Proteinen (10).....	7
Tab. 4: Zytologische Einteilung nach 2. Münchner Nomenklatur und Bethesda-System, histologische Einteilung nach 2. WHO-Nomenklatur im Vergleich (modifiziert nach (8))	12
Tab. 5: Empfehlungen zur weiteren Diagnostik abhängig vom zytologischen und vom HPV-Befund (8).....	17
Tab. 6: Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms (22).....	18
Tab. 7: Überlebensrate in Abhängigkeit vom FIGO Stadium (modifiziert nach (36))	19
Tab. 8: Anzahl zytologischer und histologischer Befunde in Kombination.....	33
Tab. 9: Histologie und Zytologie HPV-negativer Befunde (1. Zyklus).....	34
Tab. 10: HPV-Befund mit zytologischem und histologischem Befund (1. Zyklus).....	34
Tab. 11: Zytologie und Histologie HPV-negativer Befunde (2. Zyklus).....	35
Tab. 12: HPV-Befund mit zytologischem und histologischem Befund (2. Zyklus).....	36
Tab. 13: Zytologie und Histologie HPV-negativer Befunde (Heidelberg)	37
Tab. 14: HPV-Befund mit zytologischem und histologischem Befund und Viruslastein- schätzung (Heidelberg).....	38
Tab. 15: Zytologie und Histologie HPV-negativer Befunde (Jena).....	38
Tab. 16: HPV-Befund mit zytologischem und histologischem Befund (Jena)	39
Tab. 17: HPV-Befund von E7-Multiplex-Analyse und GP-5+/6+-PCR-EIA im Vergleich	40
Tab. 18: HPV-negative Proben mit zytologischer Reevaluation	42
Tab. 19: Ergebnisse aus HPV-Analysen und zytologischer Reevaluation	44

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: HPV 16 als Beispiel der HPV-Genomstruktur (modifiziert nach (9)).....7

Abb. 2: Verlauf vom normalen Zervixepithel bis zum invasiven Zervixkarzinom nach HPV-Infektion (aus (13)) 11

Abb. 3: Überblick der Proben im Verlauf31

Anhang

Charité Campus BF

Gynäkologische Tumorimmunologie

P.D. Dr. A. M. Kaufmann

Dokument Typ: Standard Protokoll	Dokument Titel: GP5+/6+ General Primer PCR für die HPV-Typisierung	Ersteller: EG
Kennung: SOP Nr. 4	Version: Nr.1.3	Datum: 17.06.08

Ziel der Methode:

Diese PCR ist eine hocheffiziente Methode, um über degenerierte Primer verschiedene HPV-Genome aus Cervix-Abstrichen zu amplifizieren.

Durchführung:

Die PCR sollte stets vormittags durchgeführt werden, damit keine DNA aus den Laboratorien verschleppt wird.

- 1) Korb mit Schlüssel aus Labor mitnehmen, frische Kittel in Tüte packen. Evtl. auch Handschuhe oder Pipettenspitzen aus dem Schrank in Tüten mitnehmen
- 2) Einen frischen gelben Kittel anziehen.
- 3) In den Glaskasten gehen, Korb/Laborkittel muss draußen bleiben.
- 4) Die Handschuhe sofort anziehen, wenn möglich über die Ärmel ziehen.
- 5) Pieper der PCR-Werkbank ausstellen, falls gewünscht
- 6) Wenn nötig Papier am Arbeitsplatz auswechseln
- 7) Mastermix aus dem Gefrierschrank nehmen und auftauen lassen unter PCR-Werkbank. Pro Probe werden 20 µl Mastermix (durch Verdünnung, laut Protokoll 40µl) gebraucht. In einem Aliquot sind 440 µl, ein Aliquot reicht also für etwas mehr als 20 Proben (vorher 10).
- 8) Während die Mixe auftauen, die 0,2 ml „Thermo-Tubes“ (DNA/RNA frei) mit den internen Patienten-DNA Nummern beschriften. Stifte in Schublade nicht unter UV-Licht legen!
- 9) Hierzu mehrere Tubes in den Deckel kippen, einzeln verschließen und in 96-Well PCR Platten (Pappkarton im Waschbecken) einsortieren, am besten bei vielen Tubes zwei Platten benutzen und immer eine Reihe frei lassen. Kontaminationsgefahr, nicht sprechen!
- 10) Die Zugabe der Polymerase und Aliquotierung der PCR-Ansätze findet unter der ANGESCHALTETEN PCR-Werkbank im Glaskasten der Nuklearmedizin statt. Lichtschalter befindet sich hinter der PCR-Werkbank.
- 11) Zusammensetzung des Mastermixes – Ansetzen im großen Gefäß, umpipettieren in 5µl Gefäße

100x master mix	Pro Probe	Komponente	Konzentration in der Reaktion
200 µl	2 µl	Primer Set 1	
(50 µl)	(0,5 µl)	(Primer Set 2) optional	
500 µl	5 µl	PCR Gold Buffer	1x
700 µl	7 µl	25 mM MgCl ²	3,5 mM
100 µl (25µl each)	1 µl	dNTP mix (10mM each)	200 µM
20 µl*	0,2 µl*	DNA Polymerase (5 U/µl)*	0,02 U/µl*

*AmpliTaq Gold PCR polymerase erst direkt vor der Messung hinzugeben!!!

- 12) zu jedem Mastermix Aliquot (5 ml Gefäß) 2 µl Taq-Polymerase hinzu pipettieren (vorsichtig am Rand pipettieren, damit möglichst wenig Polymerase an der Pipettenspitze hängen bleibt) und mischen (z.B. mit großer Pipette und 5 ml Pipettenspitzen mehrmals auf und ab pipettieren oder Gefäß mit der Hand schütteln und im Anschluss zentrifugieren, auf Ausgleichsgefäß achten)
- 13) Polymerasegefäß immer auf den Eisblock zurück stellen!
- 14) Je 20 µl in ein 0,2 ml PCR-Gefäß pipettieren und dieses in die Platte überführen
- 15) In Raum ... der Nuklearmedizin unter der PCR-Werkbank (OHNE FLOW!!!) jeweils 5µl Patientinnen-Rohextrakt hinzu pipettieren. Die PCR-Gefäße fest verschließen.

- 16) Als Negativkontrolle mit 10µl Wasser offen stehen lassen (MM).
- 17) Hinzu kommen die Tupferkontrollen (TK) und teilweise Wischproben.
- 18) Aus der Nukl.Med. ausschleusen
- 19) PCR-Gefäße in Raum 4531 in den Eppendorf-Cycler überführen
- 20) Im Menü den Ordner EG/HPV- PCR- Typisierung Amplitaq anwählen
- 21) Auf Start drücken und bei der Frage nach Tubes oder Plate Tubes anwählen und OK drücken.
- 22) Vergewissern, ob die PCR tatsächlich startet (Anzeige „running“ mit Zeitangaben).
- 23) Nach beendeter Amplifikation erfolgt die Analyse der GP5+/6+ PCR-Produkte mittels Luminex.

Benötigte Materialien:

PCR-Masternix	
Eppendorf-Taq Polymerase	Eppendorf
Aufgereinigte Patienten-DNA	
0,2 ml PCR-Gefäße	AB Gene
Extra Pipettierhilfen für Masternix (nur ohne DNA!!!)	Eppendorf
Aerosol-resistente Filtertips	Diverse
Handschuhe	Diverse
PCR-Thermocycler EP Gradient	Eppendorf
Extra Pipettierhilfe für die Zugabe der Patienten DNA	Eppendorf
96-well PCR-Platten als Wegwerf Rack	Hauptsache billig!
Zwei PCR- Werkbänke	

Troubleshooting:

Die hohe Sensitivität geht mit einer hohen Kontaminationsgefahr einher. Konzentriertes Arbeiten ist bei allen Schritten erforderlich! Handschuhe bei jeder Unsicherheit lieber erneuern.

Für das Ansetzen des PCR-Masternixes sowie der Zugabe von Taq-Polymerase mit anschließender Aliquotierung ist ein DNA-freier Kittel (gegebenenfalls OP- oder Einwegkittel) anzuziehen. Außerdem werden Herstellung des DNA-Masternixes, die Zugabe der DNA sowie DNA-Amplifikation und Analyse räumlich voneinander getrennt.

Charité Campus BF

Gynäkologische Tumorummunologie

P.D. Dr. A. M. Kaufmann

Dokument Typ: Standard Protokoll	Dokument Titel: HPV-Typisierung mit der Luminex-Technologie	Ersteller: Dr. E. Glastetter
Kennung: SOP Nr. 8b	Version: Nr. 4	Datum: 10.07.2007; 17.12.2009

Ziel der Methode:

Hybridisieren von PCR-Produkten aus dem GP5+/6+ Generalprimer System mit HPV-typspezifischen Sonden und ihre Detektion zur HPV - Typisierung

Durchführung: ABLAUFÄNDERUNG am 17.12.2009

- 1) Die interne Labomr. der Patienten DNA zunächst in ein Pipettierschema eintragen unter P:\HPV-Typisierung\Luminex\Proben und unter dem aktuellen Datum abspeichern

Berechnung der Beadmenge:

Pro Spalte (die 96 Well Platte hat insgesamt 12 Spalten und 8 Reihen!!!) werden von jeder Beadsorte 1 µl zum Hybridisierungspuffer pipettiert. Entspricht also bei einer vollbelegten Platte (96 Wells) 10 µl pro Beadsorte.

- 2) pro Probe 7 µl TE und 33 µl Beadmix berechnen. Für eine ganze Platte 3,3 ml Beadmix und 700 µl TE mixen in einem Röhrchen.
- 3) diesen Mix in ein Reservoir füllen
- 4) Mit Multikanalpipette je 40 µl mix aufziehen und zu jedem Well der 96-well PCR Platte dazu pipettieren
- 5) Nach dem Pipettierschema je 10 µl PCR-Produkt pro Well in eine 96-well PCR Platte pipettieren. Dabei die 10 µl PCR Produkt mit den vorgelegten 40 µl mix 3 mal auf und ab pipettieren zum Aufmischen der Beads.
- 6) ACHTUNG: kein Schäumen und Luftblasen, Spitzenwechsel
- 7) Abdecken der 96-well PCR Platte mit der Polyolefin-Folie
- 8) 96-well Platte in Eppendorf-PCR-Gerät in Raum 4531 einsetzen, Programm „EG/xMAP denat.“ starten und für 5 min bei 95°C denaturieren
- 9) Währenddessen, falls nötig, den 96-well Aufsatz am Thermomixer im S2-Labor installieren und dieses Gerät auf 41°C vorheizen
- 10) Die Proben-Platte dann in den -20°C Kühlakku (R4502, GS1, Fach EG) für 96-wellplatten übertragen
- 11) Nach Abkühlen der Proben (ca. 1 min) wird die Platte in den Thermomixer überführt
- 12) Bei 350 rpm schütteln und für 45 min bei 41°C hybridisieren
- 13) Vorbereitung der Waschplatte: 15 min vor Ablauf der Hybridisierungszeit eine 96-well Millipore-Waschplatte mit je 100 µl/ well Waschpuffer versehen
- 14) Auf die Absaugvorrichtung der Vakuumpumpe legen, den Waschpuffer für 15 min einwirken lassen
- 15) Waschlösung dann durch Anschalten der Vakuumpumpe entfernen. Die Vakuumpumpe wird wieder ausgemacht, wenn ein Druck von 5-10 bar erreicht ist
- 16) Die PCR-Platte mit den Proben aus dem Thermomixer nehmen
- 17) Die Abdeckfolie vorsichtig von der PCR-Platte abziehen
- 18) Mit der Multikanalpipette nach einmaligem hoch und runter pipettieren die Proben in die Waschplatte überführen. Aufpassen bei der Orientierung (d.h. Well A1 aus der PCR-Platte sollte in Well A1 der Waschplatte landen usw.), zwischen den Proben immer die Spitzen wechseln
- 19) Flüssigkeit durch Anschalten der Vakuumpumpe entfernen, siehe 15)
- 20) Die Waschplatte kann auf der Absaugvorrichtung verbleiben, wenn Waschpuffer dazu pipettiert wird
- 21) 1x waschen: 100 µl Waschpuffer in jedes Well geben und den Waschpuffer durch Betätigung der Vakuumpumpe entfernen

- 22) Vorbereitung des Färbepuffers: für eine ganze 96-well Platte werden 8 ml Färbepuffer 5 µl Streptavidin-PE (entspricht 1:1600) zugesetzt
- 23) 75 µl pro well in die mit den Proben versehene 96-well Platte pipettieren
- 24) Für 30 bis max. 40 min bei RT in einer kleinen Styropor- oder Pappbox auf einem horizontalen Schüttler (S2 Labor) inkubieren
- 25) Mit Hilfe der Vakuumpumpe nach Absaugen der Färbelösung noch 3x mit je 100 µl/Well Waschpuffer waschen
- 26) Dann in 80 µl/Well Waschpuffer aufnehmen und 5min in der Styroporbox schütteln (Horizontalschüttler in Raum 4503)
- 27) Die Proben sind nun fertig vorbereitet zur Vermessung im Biorad-Luminexgerät

Benötigte Puffer & Reagenzien*:

Bioplex™ COOH-Beads, div. Sorten jeweils an	Biorad
HPV-typspezifische Oligonukleotidsonde gekoppelt	
Hybridisierungspuffer:	0,15M TMAC (Tetramethylammoniumchlorid) 75 mM Tris-HCl, pH 8.0 6 mM EDTA, pH 8.0 1,5 g/L 1-Sarkosyl/N-Lauroylsarcosine(Sigma)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
Färbepuffer	2 M TMAC 75 mM Tris-HCl, pH8.0 6 mM EDTA, pH 8.0 1,5 g/L 1-Sarkosyl 1 mg/ml Casein
Blockpuffer-Waschpuffer	PBS 1 mg/ml Casein, pH 7.4± 0,1: 0,5g Cas. auf 500 ml PBS
Streptavidin-R-Phycoerythrin	Molecular Probes (Invitrogen) Cat. No S866

*Alle Puffer und Lösungen sollten in reinem, gekauftem Aqua bidest. angesetzt werden

Benötigte Materialien & Geräte:

96-well Polypropylen PCR-Thermoplatten	HJ-Bioanalytik GmbH
Polyolefin Abdeckfolie für Thermo PCR Platten	HJ-Bioanalytik GmbH, Art.Nr. 900320
96-well Waschplatte Multiscreen HTS,BV	Millipore
Multikanalpipetten Reservoir	
Pipettenspitzen	Roth
Vortexer	Scientific Laboratories
PCR-Gerät „Mastercycler EP Gradient“	Eppendorf
-20°C Kühlakkuständer 96-well	Eppendorf
Thermomixer mit Aufsatz für 96-Well Platten	Eppendorf
12-Kanal Pipetten 10µl, 100µl	Eppendorf
Andere Pipetten	Biohit
Vakuum Waschstation	Millipore
Bioplex-Luminex-Messstation	Biorad

MULTIMETRIX

Multiplex HPV Genotyping Kit for Research in Epidemiology

Fluorescent Bead Assay (FBA) for research in epidemiology on 24 Human Papillomaviruses (HPV) in Polymerase Chain Reaction (PCR) amplified samples, according to Schmitt et al. 2006

Kit Content: 96 tests

Cat. Nr: MMLK0124

FOR RESEARCH USE ONLY

Store components at indicated temperature immediately!

Content

I. Introduction	1
II. Intended use	1
III. Test Principle	1
IV. Kit Content	2
V. Storage	2
VI. Materials required but not provided	2
VII. Laboratory organisation	2
VIII. Sample DNA preparation	3
IX. Detailed Test Instructions	3
X. Interpretation Suggestions	5
XI. Troubleshooting	6
XII. Literature	7
Appendix: Luminex Template Settings	8

I. Introduction

More than 100 HPV types of the *Alphapapillomavirus* genus are known. 24 of the most common types have been divided into three groups based on their association to cancer: 15 high-risk types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, and 82), 3 putative high-risk types (26, 53, and 66), and 6 low-risk types primarily found in genital warts and low-grade cervical lesions (6, 11, 42, 43, 44 and 70).

II. Intended Use

In vitro test kit for epidemiologic research on Human Papillomavirus types 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 and 82 in PCR-amplified samples of genomic DNA isolated from cervical smears.

The kit was produced according to the method published by Schmitt et al. (XII). It constitutes a qualitatively superior research tool for epidemiological studies, cancer-screening programmes, the characterization of study populations in HPV trials and the evaluation of the efficacy of HPV vaccine trials.

For research use only! Not for diagnostic purpose!

III. Test Principle

Luminex Technology

The Luminex suspension array technology is based on polystyrene beads with a diameter of 5.6 µm that are internally dyed with various ratios of two spectrally distinct fluorophores. Thus, different bead sets with specific absorption spectra can be mixed and used for the multiplexed detection of different factors. Each bead set in the bead mix is coupled to a specific oligonucleotide probe. Target sequences are indirectly labelled with a third fluorophore. The bead sets can be differentiated and bound fluorescence can be quantified by a Luminex analyzer.

Hybridization Assay

The sample DNA, extracted from cervical smear, is subjected to PCR amplification, using sets of biotinylated primers contained in the kit. DNA of the named HPV types is specifically amplified by a broad range primer set. Optionally, a pair of primers for the amplification of a β-globin gene fragment can be added to the PCR in order to verify the quality of the human sample DNA. Optionally, PCR products amplified with GP5+/6+ primers may be used.

PCR products are added to the bead mix containing 26 distinct bead populations coupled to 24 HPV, one β-globin and one Hybridization Control specific oligonucleotide probe. The β-globin control serves as quality control for genomic DNA in the PCR. The Hybridization Control is spiked into one or more sample wells in order to confirm that proper hybridization conditions were applied.

After thermal denaturation and hybridization of target sequences to the bead-bound probes, labeling of the hybridized biotinylated PCR products is achieved by R-Phycoerythrin labeled Streptavidin (reporter fluorescence).

IV. Kit Content

The Kit content is sufficient for the determination of HPV genotypes in 96 samples.

Table 1: Content

	Reagent	Volume		Storage at
1.	PCR Primer set 1	210	µL	-20°C
2.	PCR Primer set 2	52	µL	-20°C
3.	Hybridization Control	120	µL	-20°C
4.	Bead Mix	4.2	mL	2-8°C
5.	Wash Buffer	100	mL	2-8°C
6.	Conjugate	0.8	mL	2-8°C
7.	Staining Buffer	7.2	mL	2-8°C
8.	96 well Hybridization Plate			2-8°C
9.	96 well Filtration Plate			2-8°C
10.	96 Lock-well Plate			2-8°C
11.	Seal Foli			2-8°C

Notes for the User

For professional use.

End-User Licence

By purchasing this kit with fluorescent dye coated microspheres, which are authorized by the Luminex Corp., the customer acquires the right to use this product only with the Luminex analyzer. The use of Luminex microspheres is covered by US patents.

Safety Precautions

Recommendation: Treat the waste bottle with a suitable disinfectant, autoclave solid waste at 121°C for 30 minutes. Follow the rules of good laboratory practice.

Assay Buffer contains sodium azide at a conc. of 0.09 % (w/v) as a preservative. Avoid contact with eyes, skin or mucous membranes.

Bead-Mix, Conjugate and Staining Buffer contain Tetramethylammonium chloride (TMAC). Solutions can be harmful if swallowed and/or irritating to skin (R22, R38). See material safety data sheets.

Waste Management

When managing the waste generated by the use of the test system adhere to all applicable regulations. Chemicals and mixtures containing chemicals and items contaminated by human specimen are, as a rule, considered hazardous and biohazardous waste. Special notes for waste disposal are listed in the safety data sheet.

Damage in Transit

If a test kit is considerably damaged, please contact the manufacturer or local distributor. Do not use considerably damaged components for a test procedure. Keep damaged components or kits until the claim has been settled. Thereafter, they should be disposed of in compliance with existing regulations.

V. Storage

The components are stable at adequate storage temperature (-20°C and 2-8°C) up to the dates indicated on the labels. Avoid more than one freeze-thaw cycle. Avoid direct light irradiation!

The components are shipped on cool packs (shipment duration must not exceed 8 days). Frozen components may thaw during shipment and must be stored at -20°C immediately after arrival.

VI. Materials Required but not provided

- Reagents/Kit for the extraction of genomic
- DNA from biological samples
- Thermocycler
- PCR reagents (Polymerase, dNTPs, PCR buffer) except primers
- Incubation oven (95°C)
- Thermomixer with PCR plate top
- Horizontal shaker
- Adjustable single channel pipettes (1-100 µL)
- Disposable sterile filter tips
- Luminex LX100 or LX200
- Vacuum Wash Station
- Vortex
- 8-Channel Pipette, (5-100 µL)

VII. Laboratory Organisation

In order to prevent contaminations of genomic DNA samples we highly recommend to perform the individual operations of the HPV genotyping kit in separate laboratory areas, each with its own set of supplies and pipettes which may not be interchanged. One laboratory is needed for sample preparation, another for PCR reagent preparation and a third room for amplification and PCR product detection. Filter tips should be used for pipetting to prevent cross-contamination between specimens. Disposable examination gloves should be used and exchanged frequently.

Laboratory 1 is used for sample preparation. This room and its equipment must be kept free of PCR products. Personnel involved in specimen processing should wear clean laboratory coats, which must not be used outside this area. During sample preparation, new disposable examination gloves should be used. Spin down sample containing vials before uncapping them. Avoid opening more than one sample containing vial at the same time. Do not process high concentrations of plasmids in this area.

Laboratory 2 is used for storage and preparation of PCR reagents. This room and its equipment must be completely kept free of PCR products, plasmid DNA and genomic DNA samples. Personnel involved in PCR reagent preparation should wear clean laboratory coats, which must not be used outside this area. When handling reagents, new disposable examination gloves must be used.

Laboratory 3 is used for amplification and PCR product detection. Personnel involved in PCR amplification and PCR product detection should wear clean laboratory coats, which must not be used outside this area and must be changed daily. Disposable examination gloves should be used.

In order to prevent specimen contamination we recommend to follow the sequence of operations described below:

1. – Preparation of samples (DNA isolation) on day 1 in laboratory 1;
2. – Preparation and aliquoting of PCR mastermixes on day 2 in laboratory 2;
3. – Performance of the Polymerase Chain Reaction on day 2 in laboratory 3;
4. – Analysis of the biotinylated PCR products on day 2 in laboratory 3.

Personnel involved in step 3 and 4 should not perform subsequently steps 1 and 2 on the same day.

Similarly, after being involved in step 2, one should not participate in subsequent work for step 1 on the same day.

VIII. Sample DNA Preparation

The kit has been successfully used with genomic DNA isolated from clinical specimens as follows:

DNA isolation from cervical exfoliated cells:

DNA was isolated from 2 mL of 20 mL total cervical swab suspension in PreservCyt® Solution (CITYC Corporation) using High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Cat. No. 11 796 828 001) according to the manufacturers instructions. Elution was performed with 200 µL Elution Buffer out of which 10 µL were subjected to PCR amplification for HPV genotyping.

IX. Detailed Test Instructions

Step 1: Amplification of HPV and β-globin specific gene fragments by PCR.

In **laboratory 1** (see section "VII Laboratory organization"), on day 1 extract genomic DNA from biological samples with established method (Materials not provided).

In **laboratory 2** (see section "VII Laboratory organization"), on day 2 prepare a mastermix for an adequate number of samples according to Table 2 in a pre-PCR area. Each sample will be amplified in a total volume of 50 µL.

Primer Set 1 contains all HPV primers: 9 forward and 3 biotinylated reverse primers (4) necessary to amplify the HPV types under investigation.

Primer Set 2 (DNA quality control primers) contains primers for the amplification of a β-globin gene fragment. It can be included in each individual PCR in order to verify the amount and the quality of human genomic sample DNA. The use of Primer Set 2 in PCR is optional.

A Negative Control containing no genomic DNA should be included in order to confirm the absence of a contamination in the amplification reactions.

Table 2: Pipetting scheme for PCR mastermix Preparation

100 x master mix	per sample	component	concentration in the reaction
200 µL	2 µL	Primer Set 1	
(50 µL)	(0.5 µL)	(Primer Set 2) optional	
500 µL	5 µL	PCR Gold Buffer	1 x
700 µL	7 µL	25 mM MgCl ₂	3.5 mM
100 µL	1 µL	dNTP mix (10 mM each)	200 µM
20 µL	0.2 µL	DNA polymerase* (5 U/µL)	0.02 U/µL

Add PCR grade water to 40 µL per sample or 4.0 mL total, respectively.

*The PCR protocol was optimized using the AmpliTaq Gold PCR polymerase, 10 x PCR Gold Buffer and

25 mM MgCl₂ from Applied Biosystems (#4311806). We therefore recommend the use of this enzyme/buffer combination.

PCR samples:

Pipette 40 µL of PCR mastermix for each sample to PCR tubes, shut the tubes and place on ice. Transfer the PCR tubes containing the PCR mastermix to **laboratory 1**.

In **laboratory 1** add 10 µL of PCR proof water to one PCR mastermix aliquot and immediately shut the PCR tube. Add 10 µL of each individual genomic DNA sample to residual PCR mastermix aliquots and immediately shut the PCR tubes. Avoid opening more than one PCR tube at a time.

Transfer PCR tubes to laboratory 3 and place the tubes in the thermocycler. Start the thermocycler with the following protocol:

PCR protocol:

	(min:sec):	
94° C	15:0	
94° C	0:20	} x 40
38° C	0:30	
71° C	0:80	
71° C	4:00	

Notes: The PCR protocol was optimized using following ramping rates: 1.8°C/sec from 94°C to 38°C, 2.0°C/sec from 38°C to 71°C and 2.8°C/sec from 71°C to 94°C

Notes: PCR products are stable for 2 weeks when stored at 2-8°C.

Optional:

Analyze 10 µL of each PCR sample in a 2% Agarose Gel, stained with Ethidium bromide or SYBR Green®. Under UV light a band of approximately 150 bp of the HPV specific PCR product and a band of 208 bp for the β-globin PCR product should be visible. Due to its limited sensitivity, this visualisation modality can not be used for pre-screening of HPV positive samples.

Step 2: Reagent Preparation and Denaturation of PCR product

Equilibrate all test components at room temperature in laboratory 3.

Initialize the Luminex analyzer according to the Luminex manual. Use template settings according to Appendix.

Pre-heat the incubation oven to 95°C.

Pre-heat the thermomixer with 96-well PCR plate top to 41°C.

Staining Solution:

Prepare **Staining Solution** by diluting **Conjugate 1:10** in **Staining Buffer** (e.g. 800 µL Conjugate to 7.2 mL Staining Buffer). For each well 75 µL **Staining Solution** should be prepared.

Bead Mix:

Resuspend the beads by vortexing the **Bead Mix** for 20 sec. Pipette 40 µL of the **Bead Mix** to each required sample well of a 96 well **Hybridization Plate**.

Negative Control:

Pipette 10 µL water in well **A1**, as **Negative Control**. Mix thoroughly by pipetting up and down several times.

Hybridization Control:

Pipette 9 µL water and 1 µL of the **Hybridization Control** to well **B1**. Mix thoroughly by pipetting up and down several times. Do not use the **Hybridization Control** 12 hours after dilution.

Optional:

Add 1 µL of Hybridization Control to each PCR product for internal control of hybridization efficiency or add 1 µL of Hybridization Control per 40 µL of Bead Mix before applying to the Hybridization Plate.

Bead Mix PCR Samples:

To each sample well, starting from **C1**, add 10 µL of PCR product. Mix thoroughly by pipetting up and down several times.

Cover the PCR plate with seal foil in order to prevent evaporation and incubate in an incubation oven at 95°C for 10 min.

Step 3: Hybridization and Wash

Immediately place the plate on ice for 1 min and transfer subsequently to the thermomixer.

Incubate at 41°C for 30 min under agitation (500 rpm) and protected from light.

Note: The hybridization incubation should be performed in the provided Denaturation / Hybridization Plates at exactly 41°C and is the most critical step to avoid false positive (temperature too low) or false negative/very weak signals (temperature too high). A 96-well thermomixer with inclined lid allows good control of temperature variations. Always close the lid of

the thermomixer during incubation and seal the plate tightly.

During hybridization, equilibrate each well of a **Filter Plate** by pipetting 100 µL **Wash Buffer** in each well and incubating the **Filter plate** for 30 min at room temperature. Remove the **Wash Buffer** by vacuum filtration.

Mix the **Bead Mix PCR samples** by pipetting up and down several times while the **Hybridization Plate** is still located in the Thermomixer and transfer the **Bead Mix PCR samples** to the **Filter Plate** with an 8-channel pipette.

Transfer the **Filter Plate** to the vacuum manifold and remove the liquid by vacuum filtration. Wash once with 100 µL of **Wash Buffer**. Remove the liquid by vacuum filtration.

Note: For optimal wash efficiency, allow the negative pressure to reach 12 inHg, do not allow the wash membrane to dry between the washing steps and do not exert more than 15 inHg negative pressure.

Shut the **Filter Plate** with the corresponding lid and remove all residual liquid from the bottom side of the **Filter Plate** by multiple vigorous blotting on a clean paper towel!

Note: Non-removed liquid on the bottom of the **Filter Plate** may lead to complete sample loss by capillary force upon contact with the shaker surface.

Step 4: Staining of hybridized PCR products

Add 70 µL **Staining Solution** to each well of the filter plate and incubate protected from light at room temperature (18-22°C) for 30 min under slight agitation (250 rpm) on a horizontal shaker.

Transfer the filter plate to the vacuum filtration manifold. Remove the liquid by vacuum filtration. Add 100 µL **Wash Buffer** to each well and remove the liquid by vacuum filtration. Repeat the wash step twice with 100 µL **Wash Buffer** per well each.

Step 5: Resuspension of the Beads

Shut the **Filter Plate** with the corresponding lid and remove all residual liquid from the bottom side of the **Filter Plate** by multiple vigorous blotting on a clean paper towel!

Note: Non-removed liquid on the bottom of the **Filter Plate** may lead to complete sample loss by capillary force upon contact with the shaker surface.

Pipette 100 µL **Wash Buffer** to the **Filter Plate** and incubate for 5 min on a horizontal shaker.

Alternatively, in order to avoid vigorous blotting of the plate, resuspend the beads in 100 µL **Wash Buffer** by pipetting up and down several times. Transfer the resuspended beads to the **96 Lockwell Plate**

supplied with the kit or any available microtiter plate, using a 8-channel pipette.

Note: Usage of different microtiter plates may require the adjustment of the Luminex probe height prior to the analysis.

Step 6: Plate Read-Out

Make sure the reservoir of the Luminex analyzer contains sheath fluid.

Place the **Filter Plate** (or the **96 Lock-well Plate**) into the Luminex analyzer and select the appropriate batch created with the corresponding template.

Note: For proper specimen analysis, it is important that the instrument is set-up, calibrated and maintained according to the manufacturer's instructions.

X. Interpretation Suggestions

The Luminex instrument analyzes the reporter fluorescence signal of at least 100 beads of each individual bead set per well. The fluorescence signals are evaluated by the software of the Luminex analyzer and are saved in a folder named with the test run in the "Output.csv" file. The fluorescence intensities of each sample are calculated as the median fluorescence intensity (MFI) and are listed in tabular form under "Data Type: Median".

We suggest to evaluate the results following the guidelines below. A reasonable number of control samples should be used with every run.

Calculation of background and Cut-off value for analytical sensitivity:

For each run and each HPV type a background and Cut-off value is calculated based on the signal of the **Negative Control** in well A1 as follows:

Background = 1.25 x Negative Control value (MFI)

Cut-off value = Background + 15 MFI

For reasons described in XI. Case 3.2, a Cut-off value of Background + 30 MFI may be chosen for HPV 16, 59 and 82 .

Negative sample: individual measured value < Cut-off
No PCR product of this HPV type detected.

Positive sample: individual measured value ≥ Cut-off
PCR products corresponding to the HPV type of this bead set detected.

Suggested interpretation of the genomic DNA quality control (Primer Set 2):

The amount and quality of the genomic DNA can partly be assessed by including Primer Set 2 into the PCR. The Primer Set 2 targets a region of the β-globin gene and is designed not to compete with the HPV primer binding site. A minimum of approx. 1000

human cellular genome equivalents are necessary for the detection of the β-globin gene in the Multiplex HPV Genotyping Kit.

Note: The Primer Set 2 cannot control for the presence of PCR inhibitors in the sample.

Based on the detection of specific HPV and β-globin PCR products and their combination, the following evaluation scheme can be applied:

Table 3: Suggested evaluation scheme for HPV and β-globin signals

Nr.	HPV signal (MFI)	β-globin signal (MFI)	Interpretation
1.	≥ Cut-off	≥ Cut-off	HPV-positive sample, sufficient DNA content
2.	> 200	< Cut-off	HPV-positive, β-globin signal potentially suppressed
3.	Cut-off - 200	< Cut-off	HPV-positive, DNA content too low or inefficient PCR
4.	< Cut-off	≥ Cut-off	HPV-negative but sufficient DNA content
5.	< Cut-off	< Cut-off	DNA content too low or inefficient PCR

Explanations:

Nr. 1: HPV and β-globin signals indicate the presence of HPV and an appropriate amount of intact DNA in the sample.

Nr. 2: Large amounts of HPV in the sample may cause competition of the β-globin amplification during PCR resulting in no β-globin signal and a simultaneous high (> 200 MFI) HPV signal.

Nr. 3: A low (< 200 MFI) HPV signal accompanied by no β-globin signal indicates insufficient cellular DNA or inefficient PCR.

Nr. 4: β-globin signals only, indicates the absence of HPV in the sample.

Nr. 5: PCR failed or no adequate genomic DNA was present in the sample.

XI. Troubleshooting

Case 1: Low or no signals on HPV type beads and Hybridization Control beads

Possible reasons:

1. Hybridization temperature was above 41.5°C
Recommendation:
Check the temperature of your thermomixer during hybridization. Make sure that the hybridization is performed under agitation as otherwise beads will settle down resulting in reduced sensitivity.
2. Amount of Hybridization Control added was too low.
Recommendation:
Repeat the experiment with proper amount of fresh diluted Hybridization Control.
3. Bead Mix was not properly mixed.
Recommendation:
Repeat the experiment with proper mixing of Bead Mix
4. An inappropriate amount of Conjugate was added
Recommendation:
Repeat the experiment with the proper amount of Conjugate.

Case 2: Low signals on HPV type beads (< 50 MFI, after background subtraction) but high signals (>400 MFI, after background subtraction) on Hybridization Control bead

Possible reasons:

1. Denaturation was inefficient.
Recommendation:
Check the temperature of the incubation oven during denaturation with independent instrument. Repeat the experiment with proper denaturation temperature (95°C).
2. The amount of specific HPV PCR products is too low due to inefficient PCR amplification.
Recommendation:
Check the presence of the amplified product on a 2% agarose gel. Follow instructions described in section "VIII Detailed instructions, PCR Protocol".

Factors influencing the efficiency of the PCR amplification:

- Amount of genomic DNA added to the amplification reaction was too high. A smear of genomic DNA is visible in the upper part of the gel.
Recommendation:
Dilute the DNA preparation and repeat the amplification by adding 10 times less genomic DNA.

- Amount of genomic DNA added to the amplification reaction was too low. No PCR product band is visible in the gel.

Recommendation:
Repeat the amplification using the proper amount DNA.

- The quality of the DNA preparation does not allow an efficient amplification.

Recommendation:
Repeat the sample preparation procedure or try a different sample preparation method.

- PCR amplification was performed with an incorrect thermal profile. Weak or no PCR product bands are visible in the gel.

Recommendation:
Calibrate the thermal cycler re-run the PCR with the correct thermal profile.

Case 3: Signals above Cut-off value on unreasonably many types of beads (false-positive suspects)

Possible reasons:

1. Hybridization temperature was below 40,5°C.
Recommendation:
Repeat the experiment with hybridization at 41°C ± 0.5°C
2. Depending on the amount of amplified product high concentrations of HPV 51 PCR products may show a weak cross-reaction with HPV 82 probe. Additionally, weak cross-reactivity may be observed with high amounts of HPV 68 and 56 PCR products and HPV 16 probe. Large amounts of HPV 33 PCR products may also cross-react with the HPV 59 probe.
3. A reduced number of wash steps was performed.
Recommendation:
Repeat the experiment with proper amount of wash steps.
4. A contamination of the sample specimens has occurred if the same specific signal pattern is visible in all samples but not in water PCR.
Recommendation:
Repeat the experiment beginning with sample preparation using fresh extraction reagents/kits.
5. A contamination of the PCR reagents has occurred, if the same specific pattern is visible in water PCR
Recommendation:
Repeat the experiment beginning with PCR amplification using freshly prepared solutions.
6. Conjugate was not properly diluted and/or the excess of conjugate was not washed away properly.
Recommendation:
Immediately after the read-out repeat the wash step three times and re-read the plate

XII. Literature

1. N. Munoz, F. X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K. V. Shah, P. J. Snijders, and C. J. Meijer. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:519-27.
2. F. X. Bosch, and S. de Sanjose. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancerburden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*:3-13.
3. M. Schmitt, I. G. Bravo, P. J. Snijders, L. Gissmann, M. Pawlita, and T. Waterboer. 2006. Bead-Based Multiplex Genotyping of Human Papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2006 Feb;44(2):504-12.
4. M. Schmitt, B. Dondog, T. Waterboer, L. Gissmann, M. Pawlita. IPV Conference, 2006, oral session: [PS 23-3] Bead-based multiplex genotyping of Human Alpha Papillomaviruses using BSGP5+6+ PCR

Appendix: Luminex Template Settings

Development Company: Multimatrix GmbH
 Created By: Multimatrix GmbH
 Template Name: Prototype MHPV
 Description: Multiplex HPV Genotyping
 Version: 1.0
 Template Type: Data Collection Only
 Doublet Discriminator

Gate
 Sample Vol (µL):50 Low Limit: 7000
 Sample Timeout (sec):60 High Limit: 20000

Table 3: Assignment of HPV types to bead populations

Name (HPV type)	Units	Description	Bead ID	Min Beads
6	MFI ¹		002	100
11	MFI		003	100
16	MFI		010	100
18	MFI		011	100
26	MFI		012	100
31	MFI		013	100
33	MFI		014	100
35	MFI		015	100
39	MFI		023	100
42	MFI		024	100
43	MFI		025	100
44	MFI		027	100
45	MFI		028	100
51	MFI		029	100
52	MFI		040	100
53	MFI		041	100
56	MFI		042	100
58	MFI		043	100
59	MFI		045	100
66	MFI		046	100
68 (ME180)	MFI		048	100
70	MFI		049	100
73	MFI		066	100
82	MFI		069	100
β-globin	MFI		067	100
Hybridization Control	MFI		070	100

Template Command:

Command	Sample Type
Warm-up	
Prime	
Wash from reservoir	Wash solution
Acquire	Test specimen

¹MFI, Median Fluorescence Intensity

Manufactured by:
 Multimatrix GmbH
 Josef-Engert-Str.9
 93053 Regensburg

Laboratory:
 Maaßstr. 30
 69123 Heidelberg

E-mail: info@multimatrix.com

Distributed by:
 PROGEN Biotechnik GmbH
 Maaßstr. 30
 69123 Heidelberg
 Phone: +49 (0) 6221 / 82780
 Fax: +49 (0) 6221 / 827823
 E-mail: diagnostics@progen.de
 Internet: www.progen.de

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sperber, Lena Sophie, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Qualitätskontrolle durch Nachuntersuchung diskrepanter Ergebnisse bei einem genotypisierenden HPV-Test** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Herrn PD Dr. rer. nat. Andreas M. Kaufmann danke ich für die Vergabe und Betreuung der Dissertation und ganz besonderes für seine Geduld und die stets wertvollen Anregungen.

Dem GTI-Labor-Team, jedoch insbesondere Ursula Schiller danke ich für die nette Einarbeitung im Labor und die stetige Unterstützung und Hilfestellung.

Herrn Prof. Dr. med. Achim Schneider MPH und den Mitarbeitern der Frauenklinik der Charité des Campus Benjamin Franklin sowie Campus Mitte danke ich für die Rekrutierung der Patientinnen und die Aufarbeitung sowie Begutachtung der Proben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M. Dürst und den Mitarbeitern des Labors für Gynäkologische Molekularbiologie der Frauenklinik des Universitätsklinikums Jena sowie Dr. Markus Schmitt und den Mitarbeitern des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg danke ich für die Untersuchung der diskrepanten Proben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. W. Kühn, Frau Dr. med. H. Perlitz und Herrn PD Dr. med. H. Ikenberg danke ich für die erneute Begutachtung der Pap-Präparate.

Ich danke meiner Schwester, Hannah Sabeth Sperber, sowie Fabian Elias Gebauer, Roland Schwarzer und Elena Vartazarova fürs Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meiner Mutter, Lieselotte, sowie meinen Geschwistern, Kaspar, Hannah, Clara, Niclas und Francis, danke ich für die fortwährende Unterstützung, Motivation und ihren Rückhalt.