

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Direktor/Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. U. B. Göbel

**Häufigkeit von humanem Papillomavirus-,
Neisseria gonorrhoeae- und *Chlamydia trachomatis*-
Infektionen bei Frauen im ländlichen Nordost-Brasilien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Viola Ehrig (geb. Pfleger)
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Prof. h. c. H. Feldmeier

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. A Kaufmann

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin
Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 01.06.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	5
1.1. CHLAMYDIA TRACHOMATIS	5
1.1.1. <i>Erreger und Krankheitsbild</i>	5
1.1.2. <i>Epidemiologie</i>	8
1.1.3. <i>Diagnose</i>	8
1.1.3. <i>Therapie</i>	9
1.2. NEISSERIA GONORRHOEAE	10
1.2.1. <i>Erreger und Krankheitsbild</i>	10
1.2.2. <i>Epidemiologie</i>	11
1.2.3. <i>Diagnose</i>	12
1.2.4. <i>Therapie</i>	12
1.3. HUMANES PAPILLOMAVIRUS	13
1.3.1. <i>Erreger und Krankheitsbild</i>	13
1.3.2. <i>Epidemiologie</i>	15
1.3.3. <i>Diagnose</i>	16
1.3.4. <i>Therapie und Prävention</i>	19
1.4. FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1. PROBANDINNEN	21
2.2. PROBENMATERIAL – GEWINNUNG, AUFBEWAHRUNG, AUFBEREITUNG	21
2.3. NACHWEISMETHODEN	22
2.3.1. <i>Nachweis von C. trachomatis und N. gonorrhoeae</i>	22
2.3.2. <i>Nachweis von HPV</i>	25
2.3.2.1. HPV-DNS Isolierung mit dem QIAamp® DNS Minikit.....	26
2.3.2.2. HPV-Nachweis mit dem Digene® SHARP Signal™-System	27
2.3.2.3. HPV-Nachweis mit Innogenetics INNO-LiPA HPV Genotyping®	31
2.4. MATERIALVERZEICHNIS	36
2.4.1. <i>Materialverzeichnis C. trachomatis und N. gonorrhoeae</i>	36
2.4.1.1. Technische Geräte	36
2.4.1.2. Chemikalien	36
2.4.1.3. kommerzielle Testkits	36
2.4.1.4. Kleingeräte und Materialien	37

2.4.2. <i>Materialverzeichnis HPV</i>	37
2.4.2.1. Technische Geräte	37
2.4.2.2. Chemikalien	38
2.4.2.3. kommerzielle Testkits	38
2.4.2.4. Kleingeräte und Materialien:	39
2.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG	41
2.5.1. <i>Datenerfassung</i>	41
2.5.2. <i>Statistische Methoden</i>	41
3 ERGEBNISSE	42
3.1. DEMOGRAPHISCHE UND SOZIOÖKONOMISCHE CHARAKTERISTIKA	42
3.2. LABORERGEBNISSE DER HPV-ANALYSE	44
3.3. PRÄVALENZ DER SEXUELL ÜBERTRAGBAREN KRANKHEITEN (STD)	46
3.4. RISIKOFAKTOREN FÜR STD	51
4. DISKUSSION	56
4.1. LABORMETHODEN	56
4.1.1. <i>Nachweis von C. trachomatis und N. gonorrhoeae</i>	57
4.1.2. <i>HPV Nachweis</i>	58
4.2. DEMOGRAPHISCHE UND SOZIOÖKONOMISCHE CHARAKTERISTIKA	59
4.3. PRÄVALENZ VON STDs	61
4.3.1. <i>HPV</i>	62
4.3.2. <i>Chlamydia trachomatis</i>	66
4.3.3. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	67
5. ZUSAMMENFASSUNG	68
6. LITERATUR	70
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	79
TABELLENVERZEICHNIS	80
DANKSAGUNG	82
LEBENS LAUF	83

1 Einleitung

Sexuell übertragbare Krankheiten (STDs) stellen weltweit ein großes, gesundheitliches Problem dar. Dies hängt mit Risikoverhalten zusammen, aber auch mit der Tatsache, dass eine adäquate Versorgung häufig nicht gegeben ist und das vor allem in ländlichen Gebieten Frauen keinen oder nur einen begrenzten Zugang zu medizinischen Einrichtungen haben. Je nach Kulturkreis, Land oder vulnerabler Bevölkerungsgruppe sind unterschiedliche Erreger von Bedeutung.

In Entwicklungsländern rangieren Krankheiten und Komplikationen, verursacht durch sexuell übertragbare Infektionen, unter den Top fünf der Krankheitskategorien [WHO 2004]. In Südamerika und der Karibik beispielsweise wird die Prävalenz für STDs auf 18,5 Millionen geschätzt, während sie in Nordamerika und Westeuropa lediglich auf drei bzw. vier Millionen geschätzt wird [WHO 2001].

Zu den häufigsten bakteriellen STDs gehören Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae*, zu den häufigsten viralen STDs gehört die Infektion mit dem humanen Papillomavirus [WHO 2004].

1.1. *Chlamydia trachomatis*

1.1.1. Erreger und Krankheitsbild

Chlamydia ist, neben *Chlamydophila*, ein Genus der Familie *Chlamydiaceae*, das der Ordnung *Chlamydiales* entstammt. Es sind kleine, obligat intrazelluläre, gram-negative Bakterien. Innerhalb der Gattungen sind drei humanpathogene Arten bekannt (Tabelle 1), die verschiedene Erkrankungen verursachen [Bush et al.2001, Jones et al.1995].

Tabelle 1: Chlamydien / Chlamydophila - Spezies, Übertragungswege und Krankheiten [nach Jones et al.1995, Bush et al.2001]

Spezies	Übertragungsweg	Krankheit
<i>C. trachomatis</i>		
Serotypen A-C	Schmierinfektion, Fliegen	Trachom
Serotypen D-K	sexuell, Schmierinfektion, perinatal im Geburtskanal	urogenitale Infektionen, PID ^a , Konjunktivitis, Pneumonie
Serotypen L1-L3	sexuell	Lymphogranulom venereum

Fortsetzung Tabelle 1 von Seite 5

Spezies	Übertragungsweg	Krankheit
<i>C. pneumoniae</i>	Tröpfcheninfektion	Bronchitis, Pneumonie, evtl. Assoziation mit koronarer Herzkrankheit
<i>C. psittaci</i>	Tröpfcheninfektion, Kontakt mit Tieren	Pneumonie (Psittakose, Ornithose)

^a pelvic inflammatory disease

Chlamydien haben einen biphasischen Lebenszyklus. Durch ihre mangelnde Fähigkeit zur Eigensynthese von Nukleotiden, insbesondere von ATP, sind Chlamydien zur Vermehrung auf die Energiereserven einer intakten Wirtszelle angewiesen. Man unterscheidet zwei Lebensformen von Chlamydien; die infektiöse, extrazelluläre Form, das Elementarkörperchen (EB), und die stoffwechselaktive, intrazelluläre Replikationsform, das Retikularkörperchen (RB).

In der Zellkultur dauert der Lebenszyklus von *C. trachomatis* etwa 48-72 Stunden (Abbildung 1). *C. trachomatis* gelangt mittels Phagozytose, Pinozytose und/oder rezeptorvermittelter Endozytose in die Zelle (Abb.1/1.). Aus unbekanntem Gründen wird die lysosomale Fusion verhindert, so dass das EB membrangeschützt, als sogenanntes Einschlusskörperchen (Abb.1/2.), in der Zelle verbleibt. Zur Vermehrung wandelt sich das EB in das RB um (Abb.1/3. und 1/4.). Ist die Replikationsphase abgeschlossen, verdichtet und verkleinert sich das RB und wandelt sich zum EB um (Abb.1/5.). Nach der Freisetzung kann das EB weitere Zellen infizieren (Abb.1/6.) [Jones et al.1995].

Der Mechanismus, wie Chlamydieninfektionen zu Entzündung, Zellzerstörung und Narbenbildung führen, ist nur teilweise verstanden. Initial kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit Einwanderung neutrophiler Granulozyten, gefolgt von Lymphozyten-, Makrophagen- und Plasmazellinfiltration in das Epithel oder Endothel.

In Folge dessen kommt es zum Zellzerfall und zur Freisetzung lysosomaler Enzyme, die zu Nekrosen führen. Bei Abklingen der Entzündung erfolgt eine Defektheilung durch Fibrosierung und Narbenbildung [Jones et al.1995].

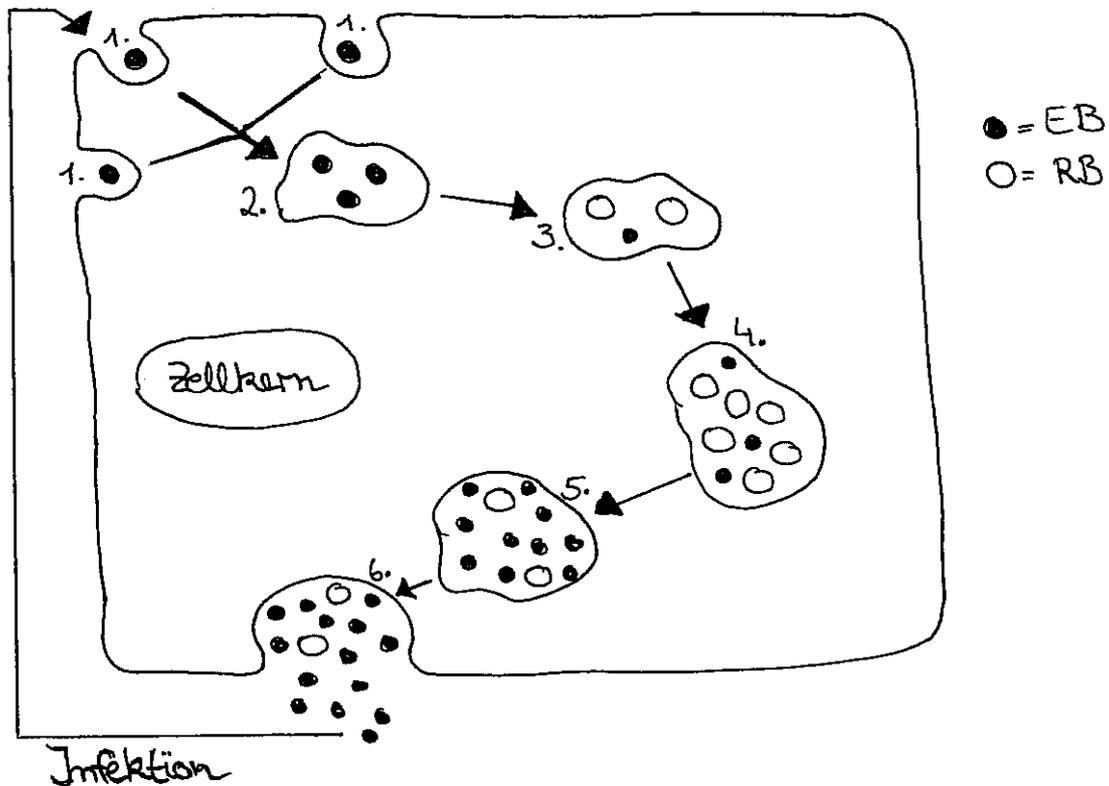


Abbildung 1: Lebenszyklus von *C. trachomatis* in der Zellkultur
[nach Jones et al.1995]

Legende: EB = Elementarkörperchen; RB = Retikularkörperchen; 1.= Zelleinfektion,
 2.= Einschlusskörperchen, 3./4.= Replikationsphase, 5.= Umwandlung RB zu EB, 6.= Freisetzung EB

C. trachomatis Serotypen D-K infizieren bei Frauen vor allem die Endozervix. Die Infektion verläuft in etwa 75 % der Fälle asymptomatisch und bleibt deshalb häufig unerkannt. Symptomatisch wird sie durch vaginalen Ausfluss, Blutungen, Unterbauchschmerzen oder Dysurie. Die Infektion kann jedoch auch schwere Komplikationen wie eine "pelvic inflammatory disease" (PID), eine ektopische Schwangerschaft und Infertilität nach sich ziehen [Jones et al.1995, Paavonen et al.1996]. Unbehandelte Schwangere können einen Abort oder eine Frühgeburt erleiden. Die perinatale Infektion des Neugeborenen kann zu Konjunktivitis und Pneumonie führen [Jones et al.1995]. Man vermutet, dass eine Chlamydieninfektion ein Kofaktor bei dem durch HPV induzierten Zervixkarzinom sein könnte [Smith et al.2004].

Auch bei Männern verläuft eine Chlamydieninfektion häufig asymptomatisch. Wird sie symptomatisch, entwickelt sich nach einer Inkubationszeit von etwa zwei bis drei Wochen meist eine Urethritis mit wenig weißem bis klarem Ausfluss und Dysurie [Gerbase et al.1998].

1.1.2. Epidemiologie

Urogenitale Chlamydieninfektion, hervorgerufen durch *C. trachomatis* Serotypen D-K, gehören weltweit zu den häufigsten bakteriell bedingten, sexuell übertragbaren Krankheiten [WHO 2001]. Als Risikofaktor für eine Infektion gelten Alter, wechselnde Sexualpartner, niedriger sozioökonomischer Status und die Einnahme oraler Kontrazeptiva [Jones et al.1995, Smith et al.2004, Araújo et al.2006].

Nach Schätzungen der WHO treten jährlich weltweit etwa 92 Millionen neue Fälle von Chlamydieninfektionen bei Personen zwischen 15 und 49 Jahren auf, die Mehrzahl der Fälle in Entwicklungsländern [WHO 2001, Gerbase et al.1998]. In Westeuropa wurde die Prävalenz für Chlamydieninfektionen zwischen 15 und 49 Jahren auf 2,7% bei Frauen und 0,8% bei Männern geschätzt [Gerbase et al.1998]. In Lateinamerika und der Karibik dagegen liegt die geschätzte Prävalenz mit 4,0% bei Frauen etwa doppelt und mit 2,5% bei Männern etwa dreimal so hoch wie in Europa [Gerbase et al.1998].

Verlässliche Daten für Brasilien sind spärlich. In selektiven Bevölkerungsgruppen wie Besucherinnen einer STD-Klinik (Alter \leq 24 Jahre) und Frauen, die eine Kinderwunsch-klinik (Altersmittel 24 Jahre) besuchten, lagen die Prävalenzdaten bei 20% bzw. 11,4% [Araújo et al.2006, Codes et al.2006], bei Frauen im Alter von 15 bis etwa 60 Jahren aus dem ländlichen Nordosten bei 6 % [Soares et al.2003].

1.1.3. Diagnose

Chlamydieninfektionen lassen sich nur labordiagnostisch nachweisen.

Die Zellkultur ist der klassische Goldstandard des Infektionsnachweises. Die Ansprüche an Transport und Bearbeitung dieser Methode sind sehr hoch und es besteht ein hohes Kontaminationsrisiko. Ein Ergebnis liegt frühestens nach etwa drei Tagen vor.

Ein zytologischer Nachweis im Abstrichmaterial ist ungeeignet, da die Interpretation schwierig ist und Sensitivität und Spezifität der Methode gering sind [Stamm et al.2004].

Eine schnelle und zuverlässige Methode stellen Antigen- oder DNS-Nachweis dar. Dazu werden sowohl Enzymimmunoassays, als auch LCR/PCR genutzt. Sie haben

eine ebenso hohe Spezifität wie der kulturelle Nachweis, bei besserer Sensitivität (Tabelle 2) [Buimer et al.1996, Carroll et al.1998]. Auf Grund dessen gelten PCR und LCR als der "neue" Goldstandard des Infektionsnachweises [VDGH 2004].

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Häufigkeitsnachweis einer Infektion mit *C. trachomatis* der Abbott LCx[®] Test, Abbott Laboratories, IL, USA genutzt. Dieser Test basiert auf dem Nachweis von Plasmid DNS von *C. trachomatis* und hat eine hohe Sensitivität und Spezifität. Da es sich bei dem Probenmaterial um Zervikallavagen handelte wurde dieses Verfahren zum Infektionsnachweis ausgewählt.

Tabelle 2: Charakteristika konventioneller Nachweismethoden für *C. trachomatis* [nach Buimer et al.1996]

Test	Sensitivität	Spezifität	Vorteil	Nachteil
Zytologie	niedrig	niedrig		Interpretation schwierig
Kultur	57 % *	100 % *	sicher	lange Dauer; strenge Voraussetzungen an Transport und Durchführung
	46 % **	100 % **		
LCR	93 % *	100 % *	schnell	teuer
	88 % **	100 % **		

Sensitivität = Wahrscheinlichkeit, mit der ein Kranker als krank erkannt wird
 Spezifität = Wahrscheinlichkeit, mit der ein Gesunder als gesund erkannt wird

* Abstrichmaterial männliche Urethra

** Abstrichmaterial weibliche Endozervix

1.1.3. Therapie

Chlamydieninfektionen werden mit Tetracyclinen und Makroliden behandelt. Die Behandlungsdauer ist abhängig vom Infektionsort [Vogel et al.2002]. Zur Verhütung von Reinfektionen muss der Partner mitbehandelt werden.

1.2. *Neisseria gonorrhoeae*

1.2.1. Erreger und Krankheitsbild

Die Art *Neisseria gonorrhoeae* gehört neben anderen zur Gattung *Neisseria*. Diese gehört ebenso wie die Gattungen *Branhamella*, *Moraxella*, *Kingella* und *Acetivobacter* zur Familie der *Neisseriaceae*. Gonokokken sind gram-negative Diplokokken, die sowohl Zylinder-, Plattenepithel- als auch Endothelzellen infizieren. Mit ihren Fimbrien heften sie sich an das Epithel (Abb.2/1.), werden endozytiert (Abb.2/2.), in Vakuolen zur Basalmembran transportiert (Abb.2/3.) und in die Submukosa entlassen (Abb.2/4.). Der Zerfall von Gonokokken in der Submukosa führt zur Aktivierung des Komplementsystems, zur Einwanderung neutrophiler Granulozyten und so zu einer eitrigen Entzündung [Sparling et al.1995].

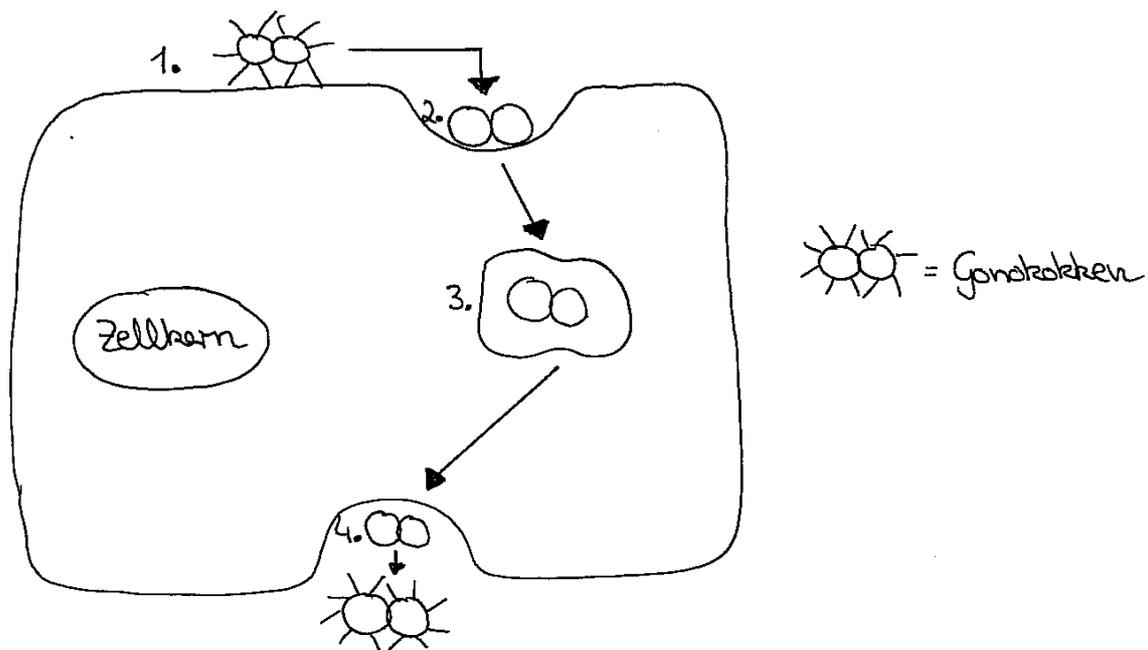


Abbildung 2: Infektionszyklus von *N. gonorrhoeae* [nach Sparling et al.1995]

Legende: 1.= Anheftung der Gonokokken, 2.= Endozytose, 3.= membrangeschützter Transport durch die Zelle, 4.= Freisetzung der Gonokokken

Die Übertragung von *N. gonorrhoeae* erfolgt in der Regel über Geschlechtsverkehr. Die Infektion führt zu einer Entzündungen des Endothels bzw. Epithels des Genitaltrakts, der sogenannten Gonorrhoe und bei Aszension zu Komplikationen wie PID, ektoper

Schwangerschaft und Infertilität. Unbehandelte, infizierte Schwangere können einen Abort oder eine Frühgeburt erleiden. Zur perinatalen Infektionen kommt es während der Geburt, wenn der Fetus durch den Geburtskanal tritt. Die Folge ist eine eitrige Konjunktivitis (Gonoblennorrhoe), die unbehandelt zur Erblindung führen kann.

Gonokokken infizieren bei Frauen vor allem die Endozervix. Nach einer Inkubationszeit von bis zu zehn Tagen zeigen sich Symptome wie vaginaler Ausfluss, Dysurie (ohne Drang und Frequenzsteigerung) und Zwischenblutungen. Die Infektion kann in bis zu 80% der Fälle asymptomatisch verlaufen [Handfield et al.2004] und bleibt dementsprechend oft unerkannt.

Bei Männern manifestiert sich eine Infektion nach etwa zwei bis fünf Tagen, meist unter dem Beschwerdebild einer akuten Urethritis mit urethralem Ausfluss und Dysurie ohne erhöhter Frequenz oder Drang. Männer werden in bis zu 95% der Fälle symptomatisch [Gerbase et al.1998], so dass die Diagnosestellung erleichtert ist und die Patienten therapiert werden können.

1.2.2. Epidemiologie

Infektionen mit Gonokokken zählen weltweit mit zu den häufigsten bakteriellen, sexuell übertragbaren Krankheiten. Als Risikofaktoren gelten, ähnlich wie bei anderen sexuell übertragbaren Krankheiten, Alter, Promiskuität, niedriger Bildungsstand und niedriger sozioökonomischer Status.

Die Prävalenz von Gonokokkeninfektionen wird in Entwicklungsländern deutlich höher geschätzt als in Industrieländern [WHO 2001]. Die genaue Datenlage ist spärlich und häufig auf bestimmte Personengruppen begrenzt.

Populationsbasierte Studien an Frauen aus ländlichen Gebieten in Brasilien, Peru und Papua-Neuguinea ergaben eine Prävalenz um 6% [Soares et al.2003, Garcia et al.2004, Mgone et al.2002]. Bei Untersuchungen an Frauen, die Kinderwunsch- oder STD-Kliniken in Guinea-Bissau, Afrika besuchten, lag die Prävalenz mit 17% höher [Gomes et al. 2001]. Eine noch höhere Prävalenz zeigten Untersuchungen an Prostituierten und Gelegenheitsprostituierten aus Madagaskar mit 38% bzw. 21% [Behets et al.2001].

1.2.3. Diagnose

Der kulturelle Erregernachweis gilt als Goldstandard der Diagnostik. Allerdings ist die Sensitivität je nach Untersuchungsmaterial starken Schwankungen unterworfen.

Der mikroskopische Erregernachweis mittels Gram- oder Methylenblaufärbung ist, abhängig vom Untersucher, hoch spezifisch und sensitiv. Es zeigen sich mikroskopisch intrazelluläre, gram-negative Diplokokken [Handfield et al.2004]. Mittels Enzymimmunoassays und LCR ist der direkte DNS-Nachweis möglich. Diese Tests (Tabelle 3) sind von Vorteil, wenn ein schnelles Ergebnis erforderlich ist oder die infrastrukturelle Voraussetzung für einen kulturellen Nachweis nicht vorhanden ist [Buimer et al.1996, Kehl et al.1998, Carroll et al.1998, Handfield et al.2004].

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Häufigkeitsnachweis einer Infektion mit *N. gonorrhoeae* der Abbott LCx[®] Test, Abbott Laboratories, IL, USA genutzt. Dieser Test basiert auf dem Nachweis des OPA Gens von *N. gonorrhoeae*. Da es sich bei dem Probenmaterial um Zervikallavagen handelte wurde dieses Verfahren zum Infektionsnachweis ausgewählt.

Tabelle 3: Charakteristika konventioneller Nachweismethoden für *N. gonorrhoeae* [nach Buimer et al. 1996, Handfield 2004]

Test	Sensitivität	Spezifität	Vorteil	Nachteil
Kultur	72,2 % *	100 % *	billig	Dauer, Ergebnis stark
	50 % **	100 % **		Materialabhängig
Gram-Färbung	95 % *	hoch	schnell	Ergebnis stark
	bis 50 % **			Untersucher- und Materialabhängig
LCR	100 % *	100 % *	schnelle, leichte Durchführung	teuer
	95,4 % **	100 % **		

*Abstrichmaterial männliche Urethra

** Abstrichmaterial weibliche Endozervix

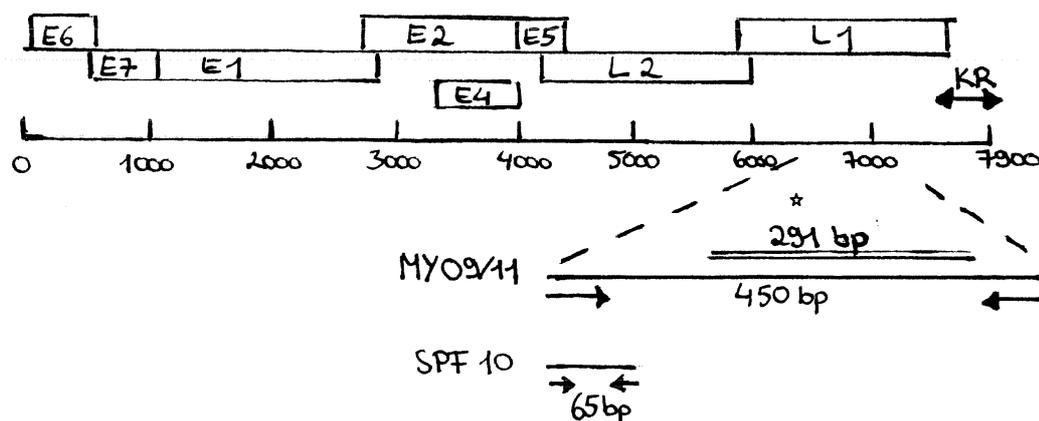
1.2.4. Therapie

Die Gonorrhoe wird antibiotisch behandelt. Eine weltweit vorhandene Resistenz, vor allem gegen Penicillin, Tetracycline und Gyrasehemmer macht eine kalkulierte antibiotische Therapie notwendig. Eine Partnerbehandlung ist erforderlich.

1.3. Humanes Papillomavirus

1.3.1. Erreger und Krankheitsbild

Das humane Papillomavirus (HPV) gehört zur Familie der Papovaviren. Sein Durchmesser beträgt 55 nm. Es hat ein eikosoedrisches Kapsid, das eine aus 7900 Basenpaaren (bp) bestehende, zirkuläre, Doppelstrang-DNS enthält. Das Genom ist funktionell in drei Regionen aufgeteilt (Abbildung 3): Eine nichtkodierende Kontrollregion (KR), welche die Replikation und Transkription überwacht, eine Region "früher" Gene (E 1-7), welche sowohl Proteine zur Virusreplikation als auch Proteine mit onkogenen Eigenschaften verschlüsselt und eine Region "später" Gene (L 1-2), welche die Kapsidproteine verschlüsselt [Bonnez et al.1995, Burd 2003].



* Klassifikationsregion der HPV-Genotypen

Abbildung 3: Schematische Darstellung des HPV-Genoms und die Position zweier Primersets [nach van Doorn et al.2001]

Die formale Klassifikation von HPV-Typen erfolgt aus einem Fragment der L1 Region des HPV Genoms (Abbildung 3). Bisher wurden etwa 100 HPV-Typen unterschieden. Diese werden, abhängig von ihrer onkogenen Aktivität, in low-risk (LRT) und high-risk (HRT) Typen unterteilt [de Villiers et al.2004]. In bis zu 90% der Fälle lässt sich HPV-DNS in malignen, zervikalen Neoplasien des Genitaltrakts nachweisen, vor allem HPV16 und 18 [Clifford et al.2003, Clifford et al.2005, Muñoz et al.2003].

Tabelle 4: Beispiele HPV bedingter Krankheitsbilder [nach de Villiers et al.2004]

HPV-Typen	Krankheit
1, 2	Warzen an Händen und Füßen
6,11 (LRT)	Condylomata acuminata, low risk CIN ^a
16, 18 (HRT)	High risk CIN, Zervixkarzinom
2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17	Epidermiodysplasia verruciformis

^a Cervikale Intraepitheliale Neoplasie

Bei engem körperlichem Kontakt infiziert HPV Zellen von Haut und Schleimhäuten. Man nimmt an, dass der Replikationszyklus beginnt, sobald das Virus in das Stratum germinativum der Epidermis gelangt (Abb.4/1.). Während sich die Basalzelle differenziert und zur Oberfläche wandert (Abb.4/2. und 4/3.), kommt es innerhalb des Zellkerns zur Synthese viraler Proteine, Replikation viraler DNS und schlussendlich zur Entstehung kompletter Viren, die durch Abschuppung von Keratinozyten freigesetzt werden (Abb.4/4.)

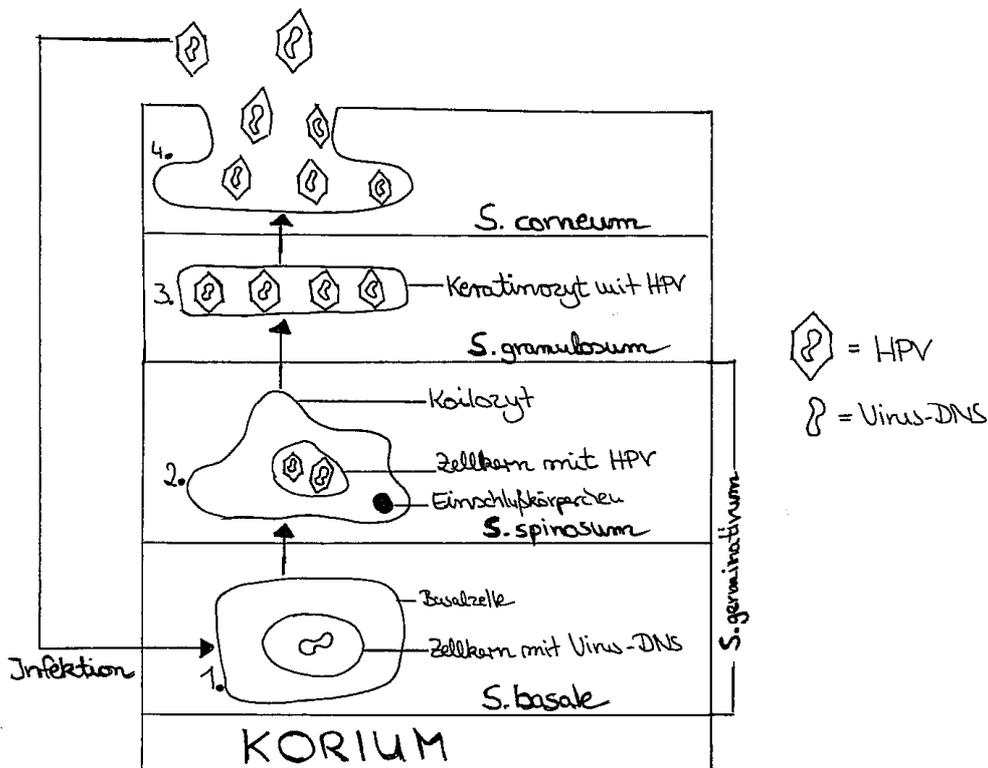


Abbildung 4: Replikationszyklus von HPV in der Haut [nach Bonnez et. al.1995]

Legende: 1.= Zellinfektion, 2./3.= Virusreplikation, 4.= Freisetzung kompletter Viren

Eine HPV-Infektion verläuft häufig subklinisch oder latent asymptomatisch, so dass ein Infektionsverdacht häufig bei Routineuntersuchungen im Rahmen der Krebsvorsorge geäußert wird. Lediglich Papillome oder Condylomata sind sichtbare Infektionszeichen und führen die Frauen häufig aus kosmetischen Gründen zum Arzt.

Im Rahmen der Erforschung des Zusammenhangs von HPV-Infektion und Karzinogenese fand man, dass die virale DNS von HPV-bedingten Läsionen mit niedrigem Entartungsrisiko extrachromosomal im Zellkern nachweisbar ist, während sie in malignen Läsionen im Zellgenom integriert vorliegt [Burd 2003]. Man nimmt an, dass das Virus an bevorzugten Orten in das Zellgenom eingebaut wird, es dabei zur Unterbrechung viraler Genregionen kommt und so die physiologische Kontrollkaskade unterbrochen wird. Dies führt zu expansiver Proliferation, Verlust der Zelldifferenzierung, Störung der Apoptose und schließlich zu Malignität [Bonnez et al.1995].

1.3.2. Epidemiologie

Infektionen mit HPV gehören weltweit zu den häufigsten sexuell übertragbaren Virus-erkrankungen. Eine HPV-Übertragung erfolgt durch sexuellen Kontakt. Risikofaktoren sind unter anderem Alter, Promiskuität und das Vorliegen anderer sexuell übertragbarer Krankheiten, vermutlich vor allem *C. trachomatis* [Krüger Kjaer et al.1997, Smith et al.2004]. Das Lebensalter beeinflusst auch die Infektionsprävalenz. Jüngere Frauen zwischen 20 und 30 Jahren sind deutlich häufiger infiziert als ältere Frauen [Koutsky 1997, Clifford et al.2005]. Sowohl im Vergleich verschiedener Länder als auch innerhalb eines Landes ist die HPV-Prävalenz unterschiedlich. In Nigeria lag die Häufigkeit einer HPV-Infektion bei Frauen über 15 Jahren bei bis zu 26,3% [Thomas et al.2004, Clifford et al.2005]. Bei Frauen in Südamerika dagegen war die Prävalenz geringer; ca. 16,7% in Argentinien, 14,6% in Kolumbien und 10,8% in Chile [Matos et al.2003, Clifford et al.2005].

Für Brasilien gibt es nur wenig zuverlässige Daten. Häufig handelt es sich dabei um Daten aus speziellen Personengruppen wie HIV-infizierte Frauen (65-78%) oder Frauen mit zervikalen Neoplasien (76%) [Levi et al.2002, Queiroz et al.2004, Rabelo-Santos et al.2003]. Dagegen zeigten Studien an Frauen aus ländlichen Gebieten eine Prävalenz zwischen 14 und 26% [Brito et al.2002, Soares et al.2003].

Die Infektionshäufigkeit in Europa ist deutlich geringer, weist aber ebenfalls regionale Unterschiede auf. Bei Frauen zwischen 15 und 74 Jahren in Italien beispielsweise lag die Prävalenz bei 9,2%, in Spanien bei nur 1,4% in den Niederlanden dagegen bei 7,7% [Clifford et al.2005].

Das Vorkommen der verschiedenen HPV-Typen unterliegt ebenfalls regionalen Unterschieden. HPV-Typ 16 (HRT) beispielsweise, der höchstwahrscheinlich weltweit häufigste HPV-Typ, ist bei Frauen über 15 Jahren im subsaharischen Afrika zu 8% nachweisbar. In Asien und Südamerika dagegen ist er mit 14 bzw. 15% und in Europa mit 21% häufiger vertreten. Im Gegensatz dazu ist der ebenfalls häufige HPV-Typ 18 (HRT) in allen vier Regionen mit vier bis fünf Prozent in gleicherweise verteilt [Clifford et al.2005].

1.3.3. Diagnose

Der Nachweis von viraler DNS sichert die Diagnose einer HPV-Infektion. Einzelne etablierte Methoden zum DNS-Nachweis sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Sensitivität der diversen DNS-Nachweismethoden kann durch eine zuvor durchgeführte Vervielfältigung der DNS mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) erhöht werden.

Das Papillomavirus wächst nicht in der Zellkultur. Serologische Tests können nicht zwischen einer akuten und einer alten Infektion unterscheiden und sind daher nicht zur Diagnostik geeignet. Die im Rahmen der klinischen Diagnostik und Krebsvorsorge genutzte zytologische und histologische Untersuchung (Tabelle 5) erlaubt keinen direkten HPV-Nachweis, sondern weist Infektionsfolgen nach. Sie stellen einfache und günstige Screeningmethoden dar.

Zytologisch ist der Abstrich nach Papaniculau (Pap) gebräuchlich. Je nach Infektionsgrad lassen sich Koilozyten und Dysplasien nachweisen, wobei häufig gerade die HPV-typischen Koilozyten nicht nachweisbar sind.

Das Bild der histologischen Untersuchung ist ebenfalls vom Infektionsgrad geprägt. In floriden Infektionen lassen sich unter anderem Dyskeratosen, Pankeratosen, Akanthosis und vielkernige Zellen nachweisen.

Auffällige Pap-Abstriche und/oder auffällige Histologien stellen eine Indikation zur Kolposkopie dar. Makroskopisch nicht sichtbare Veränderungen lassen sich mit der erweiterten Kolposkopie nachweisen (Tabelle 6).

Zusätzlich zur Zytologie besteht bei Frauen im Rahmen des Screenings zur Krebsfrüherkennung die Indikation zum HPV DNS-Nachweis bei einem unklaren zytologischen Befund, bestehenden Präkanzerosen und nach Konisation wegen dysplastischer Veränderungen [Weissenbacher et al.2001].

Tabelle 5: Charakteristika konventioneller HPV Screeningmethoden [nach Trofatter 1997]

Test	Sensitivität	Spezifität	Vorteil	Nachteil
Inspektion	niedrig	hoch	einfach, schnell	nur makroskopisch deutliche Veränderungen nachweisbar, keine Typisierung möglich
Pap-Abstrich	15 – 50%	~ 90%	preisgünstig	keine Typisierung möglich
Kolposkopie	mittel	niedrig	Nachweis makroskopisch unauffälliger Läsionen	keine Typisierung möglich, nur Extozervix beurteilbar

Tabelle 6: Befunde der erweiterten Kolposkopie [nach Ebert et al.1998]

Verfahren	physiologischer Befund	pathologischer Befund
Applikation von 3-5 %iger Essigsäure	Anämisierung und Ausfällung des Zervixschleims	Leukoplakie, Mosaik, Punktierung, Gefäßatypien
Schiller–Jodprobe	tiefe Braunfärbung normalen Plattenepithels	hellbraun-, gelb- oder nicht anfärbendes Epithel

Tabelle 7: Charakteristika von DNS-Tests zum HPV-Nachweis**[nach Trofatter 1997, Schiffmann et al.2000, Kletter et al.1999]**

Test	Sensitivität	Spezifität	Handhabung	Kommentar
Dot Blot	moderat	hoch	gut	Schneller und relativ preisgünstiger Test
in situ-Hybridisierung	moderat	hoch	gut	Lokalisierung von HPV-DNA im Gewebe möglich
Flüssig-Hybridisierung	hoch	hoch	gut	geeignet für die klinischen Routine
HCII-Test*	80,8 - 93,2%	80,2 - 94%	gut	geeignet für die klinische Routine
Line blot assay	hoch	Hoch	gut	HPV Typisierung möglich, geeignet für die klinische Routine
INNO-LiPA**	100%	97,8%	gut	Nachweis verschiedener Genotypen in einem Testdurchlauf möglich

* Digene® SHARP Signal™-System der Firma Digene Corporation, Gaithersburg, MD USA

**INNO-LiPA HPVGenotyping® Test der Firma Innogenetics NV, Ghent, Belgien

Um in der vorliegenden Arbeit eine Aussage über die Häufigkeit von HPV-Infektionen im Untersuchungskollektiv treffen zu können wurden zwei verschiedenen HPV-Tests angewendet. Zunächst wurde das Digene® SHARP Signal™-System der Firma Digene Corporation, Gaithersburg, MD USA verwendet. Dieser Test basiert auf dem photometrischen Nachweis von, in Lösung entstandenen, RNS-DNS Hybriden. Es werden zwei Sonden-pools verwendet, die den Nachweis von LRT (Typ 6, 11, 42, 43 und 44) und HRT (Typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68) ermöglichen. Eine Unterscheidung zwischen einzelnen HPV-Typen innerhalb einer Gruppe ist nicht möglich.

Um eine Aussage sowohl über die Prävalenz bestimmter Typen als auch über die Typenverteilung treffen zu können wurde zusätzlich der INNO-LiPA HPVGenotyping® Test der Firma Innogenetics NV, Ghent, Belgien eingesetzt.

Testprinzip ist der Nachweis einzelner HPV-Typen nach DNS-Amplifikation mittels Teststreifen. Es lassen sich Einfach- und Mehrfachinfektionen mit 25 HPV Typen (Typ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 74) nachweisen. Beide Methoden sind etablierte Standardverfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität [Kleter et al.1999, Schiffman et al.2000, Guyot et al.2003, Perrons et al.2005], die, auf Grund ihrer guten Handhabung, zur Untersuchung von Zervikallavagen einer großen Studienpopulation für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurden.

1.3.4. Therapie und Prävention

Bislang gibt es noch keine kausale Therapie zur Behandlung von HPV-Infektionen. Symptomatisch lassen sich HPV-Infektionen unter anderem chirurgisch oder zytotoxisch mit Podophyllotoxin oder Trichloressigsäure behandeln [Weissenbacher et al.2001].

Im Juni 2006 wurde von der US Food and Drug Administration ein quadrivalenter Impfstoff (Gardasil[®]) der Firma Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ) für Mädchen und Frauen zwischen 9 und 26 Jahren, zur Vorbeugung von Genitalwarzen, Gebärmutterhalskrebs und Präkanzerosen bzw. dysplastischen Veränderungen des Genitaltrakts zugelassen [Monk et al.2006]. Seit Oktober 2006 ist dieser Impfstoff auch in Deutschland zugelassen.

In einer klinischen Studie an Frauen zwischen 16 und 23 Jahren, die zwischen 1998 und 1999 in den USA durchgeführt wurde, um die Wirksamkeit des monovalenten HPV16-Impfstoffes der Firma Merck prüfen, konnte eine hundertprozentige Wirksamkeit der HPV16 Impfung nachgewiesen werden [Koutsky et al.2002]. Die hohe Wirksamkeit von Gardasil[®] wurde in vier klinischen, placebo-kontrollierten, doppel-blinden, randomisierten Phase II und III Studien der Firma Merck & Co belegt.

Durch die Impfung verspricht man sich einen Schutz gegen Infektionen mit HPV16 und 18, die in etwa 70% aller Zervixkarzinome nachweisbar sind und gegen HPV6 und 11, die in schätzungsweise 90% der Fälle von Genitalwarzen nachgewiesen werden können [Steinbrook 2006]. Die Zulassung eines bivalenten Impfstoffes (Cervarix[®]) der Firma Glaxo Wellcome UK Ltd. (Uxbridge, Middelsex, UK) gegen HPV16 und 18 wird 2007 erwartet [Steinbrook 2006].

1.4. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Feststellung der Häufigkeit von *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* und HPV bei Frauen aus einem ländlichen Gebiet im Nordosten Brasiliens, um, in Abhängigkeit von demographischen, sozio-kulturellen und ökonomischen Variablen, eine Aussage über die tatsächliche Bedeutung dieser Infektionen machen zu können. Die Risikofaktoranalyse ist Inhalt einer anderen Dissertation.

2 Material und Methoden

2.1. Probandinnen

Die Probandinnen waren Teilnehmer einer bevölkerungsbasierten Studie, die im Jahr 2002 im Landkreis Pacoti im Bundesstaat Ceará im Nordosten Brasiliens durchgeführt wurde. Die Gemeinde liegt 736 Meter über dem Meeresspiegel in der Serra de Baturité, 83 km von Fortaleza, der Hauptstadt des Bundesstaates Ceará entfernt. Pacoti hat 11.524 Einwohner, von denen 2.656 (23%) im Stadtgebiet, die übrigen in kleinen Weilern des Landkreises leben. Die gesamte Studie war als bevölkerungsbasierte Querschnittsstudie mit drei Armen angelegt: 1. Erfassung von Wissen, Perzeption und Verhalten in Bezug auf sexuell übertragbare Krankheiten (KAP-Studie), 2. komplette gynäkologische Untersuchung inklusive Kolposkopie und Zervikallavagen, 3. labor-diagnostische Abklärung der wichtigsten Ursachen sexuell übertragbarer Krankheiten. Die Dissertation beschäftigt sich mit dem dritten Teil.

Zur Zielgruppe gehörten alle Frauen zwischen 12 und 49 Jahren mit Wohnsitz in Pacoti und den Weilern Volta do Rio, Germinal, Caititu, Holandina, Araticum, Santa Quitéria und Rolador. Diese wurden durch die Register des örtlichen *Programa de Saúde da Família (PSF/ Familiengesundheitsprogramm)* identifiziert. Die demographischen und sozioökonomischen Charakteristika der Studienteilnehmerinnen wurden von der leitenden Gynäkologin der Studie erfasst.

2.2. Probenmaterial – Gewinnung, Aufbewahrung, Aufbereitung

Die gynäkologische Untersuchung und Probengewinnung wurde von der leitenden Gynäkologin im *Hospital Municipal Padre Quiliano*, des einzigen Krankenhauses von Pacoti, durchgeführt.

Probandinnen, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung noch nicht sexuell aktiv waren, wurden von der Materialentnahme ausgenommen.

Die Zervikallavagen wurden nach Spülung der Cervix uteri mit 0,9%iger physiologischer Kochsalzlösung in sterilen Probenröhrchen gesammelt.

Nach der Materialentnahme wurden die Zervikallavagen sofort bei -20°C eingefroren.

Der Transport nach Deutschland erfolgte auf Trockeneis.

Hier wurden die Proben bis zur Aufbereitung bei -70°C gelagert.

Das Nativmaterial wurde aufgetaut und durch schütteln gut resuspendiert.

Ein Milliliter wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 9000 x g 15 Minuten lang zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit einer Pipette innerhalb von 15 Minuten vollständig entfernt, ohne das Sediment zu berühren.

Unter Zugabe von 1 ml Ligase-Ketten-x-Resuspensionspuffer wurde die Probe solange im Vortex-Mixer geschüttelt, bis sich das Pellet vollständig vom Boden gelöst hatte. Das Zentrifugenröhrchen wurde 15 Minuten im Ligase-Ketten-x-Trockenbad bei 97°C erwärmt und anschließend bei Raumtemperatur 15 Minuten gekühlt.

Die aufbereiteten Proben wurden entweder sofort analysiert oder bis zu 60 Tage bei -20 °C zwischengelagert.

2.3. Nachweismethoden

2.3.1. Nachweis von *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae*

Der Nachweis einer *C. trachomatis*- bzw. *N. gonorrhoeae*-Infektion wurde mit dem Abbott LCx[®] *Chlamydia trachomatis*-Assay bzw. *Neisseria gonorrhoeae*-Assay (Abbott, Wiesbaden) erbracht. Dieses Assay basiert auf dem Prinzip der Ligasekettenreaktion (LCR). Die LCR ist ein der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwandtes Nachweisverfahren, das auf der Vervielfältigung und Neusynthese von bekannten DNS-Abschnitten beruht. Es werden pro Reaktion vier Oligonukleotidsonden verwendet, von denen je zwei komplementär zum Positivstrang und zwei zum Negativstrang sind. Da die Polymeraseaktivität fehlt, entsteht bei der Hybridisierung der Sonden mit der Zielsequenz eine Lücke. Diese Lücke wird durch die thermostabile Ligase verschlossen. Das entstandene Amplifikat dient im nächsten Zyklus selbst als Zielsequenz. LCR-Produkte mit einem markierten 3'- und 5'-Ende sind einer Detektion zugänglich. Diese Markierung wird durch die Oligonukleotidsonden gewährleistet. Das LCR-Produkt wird mittels Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA) photometrisch nachgewiesen.

Mit diesem Verfahren wurde aus den Proben der Probandinnen Plasmid-DNS von *C. trachomatis* (Tabelle 8) und DNS von *N. gonorrhoeae* (Tabelle 8) mit dem Abbott LCx[®] Test nachgewiesen.

Tabelle 8: Durchführung des Abbott LCx[®] *Chlamydia trachomatis*-Assay und *Neisseria gonorrhoeae*-Assay (nach Herstellerangaben)

Vorbereitung	
Amplifikation	
Kalibrator herstellen	100 µl Aktivierungsreagenz in das Kalibratorfläschchen pipettieren 2-5 Sekunden im Vortex Mixer mischen
Kontrolle herstellen	100 µl Aktivierungsreagenz in das Kontrollfläschchen pipettieren 2-5 Sekunden im Vortex-Mixer mischen
Thermocycler programmieren	40 Zyklen á :1 Sekunde bei 93°C, 1 Sekunde bei 59°C , 1 Minute 10 Sekunden bei 62°C
Durchführung	
Amplifikation	
Kalibrator	zwei mal 100 µl Kalibrator in ein Amplifikationsröhrchen pipettieren 10-15 Sekunden bei > 9000 x g zentrifugieren
Negativkontrolle	zwei Mal 100 µl Negativkontrolle in ein Amplifikationsröhrchen pipettieren 10-15 Sekunden bei > 9000 x g zentrifugieren
Proben	100 µl in ein Amplifikationsröhrchen pipettieren 10-15 Sekunden bei > 9000 x g zentrifugieren
Amplifikation	Amplifikationsröhrchen in den Thermocycler verbringen Programm starten
Durchführung	Amplifikationsröhrchen 10-15 Sekunden bei > 9000 x g zentrifugieren
Detektion	LCx Karussell mit Reaktionszellen bestücken und Amplifikationsröhrchen in folgender Reihenfolge einsetzen: Position 1 und 2 : Negativkontrolle Position 3 und 4 : Kalibrator Position 5 bis 24 : Probe

	<p>Reagenzienpackung schwenken und in der Reihenfolge von 1 bis 4 öffnen; entstandenen Schaum/Luftblasen mit Pipettenspitze entfernen</p> <p>LCx Analysegerät starten</p>
Auswertung	Alle Berechnungen werden automatisch durch das LCx Analysegerät durchgeführt.
Testgültigkeit	Der Testdurchlauf ist gültig, wenn die Einzelergebnisse und Mittelwerte der Negativkontrollen und Kalibratoren den vorgegebenen Assayparametern des Analysegerätes entsprechen.
Ergebnisberechnung	
<i>C. trachomatis</i>	<p>Der Quotient (S/CO), des ermittelten Probenwertes (S) und des Grenzwertes (CO), weist das Vorliegen oder Fehlen von Plasmid-DNS nach.</p> <p>CO = 0,45 x Mittelwert der LCx Kalibrator-Werte</p>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<p>Der Quotient (S/CO), des ermittelten Probenwertes (S) und des Grenzwertes (CO), weist das Vorliegen oder Fehlen von <i>N. gonorrhoeae</i> nach.</p> <p>CO = 0,25 x Mittelwert der LCx Kalibrator-Werte</p>
Interpretation	
<i>C. trachomatis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - positives Ergebnis: $S/CO \geq 1,00$ - negatives Ergebnis: $S/CO < 0,8$ - Grauzone (EQV): $S/CO \geq 0,8$ und $< 1,00$ <p>Proben mit EQV-Ergebnissen werden mit frischaufbereitetem Material wiederholt. Ist S/CO in der Wiederholung $\geq 1,00$ ist die Probe positiv, ist sie $< 1,00$ ist sie negativ.</p>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - positives Ergebnis: $S/CO \geq 1,20$ - negatives Ergebnis: $S/CO < 0,80$ - Grauzone (EQV): $S/CO \geq 0,8$ und $< 1,20$ <p>Proben mit EQV-Ergebnissen werden mit frischaufbereitetem Material wiederholt. Ist S/CO in der Wiederholung $\geq 1,00$ ist die Probe positiv, ist sie $< 1,00$ ist sie negativ.</p>

2.3.2. Nachweis von HPV

Zunächst wurde mit dem QIAamp[®] DNS Minikit (Qiagen GmbH, Hilden) DNS aus dem Probenmaterial isoliert (Tabelle 9). Der Nachweis einer HPV-Infektion erfolgte sodann mit dem Digene SHARP Signal[®]-Test (Digene, USA), einem Test auf PCR-Basis.

Die PCR ist ein Verfahren zur selektiven Vervielfältigung und Neusynthese bestimmter DNS-Abschnitte. Dazu sind mehrere Reaktionszyklen notwendig, die von Temperaturveränderungen abhängig sind. Der DNS-Doppelstrang wird aufgetrennt und es lagern sich synthetische Oligonukleotidsonden (Primer) an jeden Einzelstrang so an, dass sie den zu vervielfältigenden DNS-Abschnitt einrahmen. Mit Hilfe der DNS-Polymerase wird dieser Abschnitt im folgenden Schritt vervielfältigt und es entstehen zwei identische DNS-Doppelstränge. Diese dienen im nächsten Zyklus ebenfalls als Ziel-DNS.

Der Digene Test verwendet die Primer MY09 und MY11. Dieses Primerset gehört zu den sogenannten allgemeinen Primern, die ein breites Spektrum von HPV-Typen vervielfältigen. MY09/11 umfasst eine Mischung verschiedener Oligonukleotide und amplifiziert ein 450bp großes Fragment der L1 Region von HPV (Abbildung 3) [van Doorn et al.2001]. Der Ablauf des Digene-Tests ist Tabelle 10 und Tabelle 11 zu entnehmen.

Zur Bestimmung konkreter HPV-Genotypen wurde der INNO-LiPA HPV Genotyping[®] Test (Innogenetics N.V., Belgien), einem Test auf PCR Basis, durchgeführt. Dieser Test verwendet zur DNS-Amplifikation das Primergemisch SPF10. SPF10 gehört zu den allgemeinen Primern und amplifiziert ein 65bp großes Fragment aus der L1 Region des HPV Genoms amplifiziert (Abbildung 3) [van Doorn et al.2001]. Der Testablauf ist in Tabelle 12 und Tabelle 14 dargestellt.

Nur Proben, die im Digene Test ein positives Ergebnis erbrachten wurden mit dem INNO-LiPA Test untersucht. Proben mit einem klar positiven Ergebnis (Absorption $\geq 1,00$) wurden ohne weiteres mit dem INNO-LiPA Test untersucht. Digene positive Proben mit einer Absorption $> \text{Cutoff} < 1,00$ wurden zunächst mit dem Digene Test wiederholt und nur bei einem erneut positiven Ergebnis mit dem INNO-LiPA Test untersucht.

Aus Kostengründen wurde nach der INNO-LiPA PCR eine Agarose-Gelelektrophorese (Tabelle 13) durchgeführt.

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren, um DNS-Stränge ihrer Größe nach zu trennen. Im Vergleich mit Strängen bekannter Größe lässt sich die Größe der unbekanntenen DNS-Stränge dann bestimmen. Die zu untersuchenden Proben werden auf ein

Gel aufgetragen, das in einer ionischen Pufferlösung liegt. Durch die Anlage eines elektrischen Feldes werden die negativ geladenen DNS-Moleküle, je nach Größe unterschiedlich schnell, durch die Gelmatrix zur Anode gezogen. Das für die Elektrophorese verwendete Ethidiumbromid lagert sich in die DNS ein und wird durch seine fluoreszierenden Eigenschaften im UV-Licht sichtbar.

Elektrophorese-positive Proben wurden der INNO-LiPA Detektion zugeführt. Elektrophorese-negative Proben, die bis dahin erst einmal mit dem Digene Test untersucht worden waren, wurden daraufhin mit diesem wiederholt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Studienteilnehmerinnen positiv auf das Vorliegen einer HPV-Infektion gewertet, bei denen die Untersuchung mit dem INNO-LiPA Test ein positives Ergebnis erbrachte.

2.3.2.1. HPV-DNS Isolierung mit dem QIAamp[®] DNS Minikit

Tabelle 9: DNS-Extraktion mit QIAamp[®] DNS Minikit (nach Herstellerangaben)

Vorbereitung	
Trockenbad erwärmen	70°C
Herstellung Puffer AW1	19 ml Puffer AW1 Konzentrat, 25 ml 96%iges Äthanol mischen
Herstellung Puffer AW2	13 ml Puffer AW2 Konzentrat, 30 ml 96%iges Äthanol mischen
Durchführung	
	200 µl Probe, 20 µl Proteinase K und 200 µl AL Puffer in 1,5 ml konisches Röhrchen pipettieren und im Vortex-Mixer mischen
Inkubation	10 Minuten bei 70°C im Trockenbad
	200 µl 96%igen Äthanol hinzufügen und mischen Probe auf eine Qiagensäule mit Unterröhrchen auftragen
Zentrifugation 1	1 Minute bei 8000 rpm (6000 x g)
Waschen 1	Säule auf neues Unterröhrchen setzen; 500 µl Puffer AW1 zugeben
Zentrifugation 2	1 Minute bei 8000 rpm (6000 x g)
Waschen 2	Säule auf neues Unterröhrchen setzen; 500 µl Puffer AW2 zugeben
Zentrifugation 3	3 Minuten bei 14000 rpm (20000 x g)

	Säule auf 1,5 ml Spitzröhrchen setzen, 100 µl 70°C warmen Elutionspuffer zugeben
Zentrifugation 4	1 Minute bei 8000 rpm
	1,5 ml Spitzröhrchen verschließen DNS-Extrakt seiner weiteren Verwendung zuführen

2.3.2.2. HPV-Nachweis mit dem Digene® SHARP Signal™-System

Der Digene SHARP Signal®-Test ist ein System, das DNS-RNS Hybride zum photometrischen Nachweis biotylinierte PCR Produkte benutzt. Dazu wird ein Teil aus der L1 Region des HPV Genoms mittels PCR (Primer MY09/11) amplifiziert. Das PCR Produkt wird denaturiert und mit einem RNS-Sondengemisch in Lösung hybridisiert. Es werden zwei Sondengemische verwendet mit denen zwei HPV-Gruppen nachgewiesen werden. Das Sondengemisch A weist HPV-Typen der low-risk-Gruppe (HPV 6, 11, 42, 43 und 44) und das Sondengemisch B Typen der high-risk-Gruppe (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68) nach.

**Tabelle 10: Digene SHARP Signal System® - Amplifikation
(nach Herstellerangaben)**

VORBEREITUNG	
AMPLIFIKATION	
Amplifikationsröhrchen-deckel	8 µl Magnesiumchlorid (MgCl ₂) je Deckel pipettieren und bei 70°C im Brutschrank trocknen lassen
Amplifikationskasten bestücken	1 Amplifikationsröhrchen je Probe
Herstellung Amplifikationsgemisch	73 µl destilliertes Wasser, 10 µl PCR Puffer, 1 µl dNTPs, 2,5 µl Primer MY 09, 2,5 µl Primer MY 11, 0,5 µl Triton X-100 und 0,5 µl Ampli-Taq-DNS-Polymerase (= 90 µl) je Probe mischen
Programmierung Thermocycler	3 Minuten bei 94°C, 2 Minuten bei 80°C, 10 Mal 1 Minute bei 94°C, 2 Minuten bei 56°C, 35 Mal 1 Minute bei 90°C, 2 Minuten bei 56°C und 15 Minuten bei 56°C

DURCHFÜHRUNG AMPLIFIKATION	
Kontrolle/Probe	10 µl Kontrolle (HPV16) / Probe und 90 µl Amplifikationsgemisch in ein Amplifikationsröhrchen pipettieren und mit einem Amplifikationsdeckel verschließen
Thermocycler	Kontrolle und Proben in den Thermocycler verbringen und Programm starten; während des 80°C Zyklus die Amplifikationsröhrchen entnehmen und so wenden, dass der Röhrcheninhalt mit dem Deckel in Kontakt kommt. Das im Deckel befindlichen MgCl ₂ startet die PCR.

Tabelle 11: Digene SHARP Signal System® - Detektion (nach Herstellerangaben)

Vorbereitung Detektion	
SHARP Signal System	auf Raumtemperatur erwärmen
PCR Produkte	auf Raumtemperatur erwärmen
Micro-Amp-Ständer	mit Hybridisierungsröhrchen bestücken: 2 Röhrchen pro Probe 2 Röhrchen pro negative Testkontrolle 2 Röhrchen pro positive Testkontrolle
Herstellung Sondenmischung A	25 µl je Probe 1 Teil RNA Probe A mit 49 Teilen Probenlösung mischen
Herstellung Sondenmischung B	25 µl je Probe 1 Teil RNA Probe B mit 49 Teilen Probenlösung mischen
Waschpuffer herstellen	Waschpuffer in 3 Liter destilliertem Wasser auflösen
Mikrotiterstreifen berechnen	2 Vertiefungen je Probe und Kontrolle 2 Vertiefungen für die Substratkontrolle Mikrotiterplatte mit Mikrotiterstreifen bestücken
Substratlösung herstellen	100 µl je Probe 1 Teil Substratkonzentrat mit 49 Teilen

	Substratverdünnungsmittel mischen
Durchführung Detektion	
Probendenaturierung	50 µl Probenverdünnungsflüssigkeit, 25 µl Denaturierungsreagenz und 5 µl Probe bzw. 5 µl Kontrolle je Hybridisierungsröhrchen pipettieren und im Vortex-Mixer mischen (lila Farbumschlag) 10 Minuten bei 20-25 °C inkubieren
Probenhybridisierung	25 µl Sondenmischung A je Probe und Kontrolle pipettieren, 5 Sekunden mit dem Vortex-Mixer mischen (gelber Farbumschlag) 25 µl Sondenmischung B je Probe und Kontrolle pipettieren, 5 Sekunden mit dem Vortex-Mixer mischen (gelber Farbumschlag) 30 Minuten bei 65°C im Thermocycler inkubieren
Plattenhybridisierung	100 µl Kontrollen, 100 µl Proben in die Mikrotiterplatte pipettieren Platte abkleben und 30 Minuten bei 20-25°C inkubieren, bei 1200 rpm schütteln
Detektion	Proben und Kontrollen absaugen 100 µl Detektionsreagenz pro Vertiefung pipettieren (außer Substratleerwert) 30 Minuten bei 20-25°C inkubieren, bei 1200 rpm schütteln Mikrotiterplatte fünfmal mit Waschlösung waschen, anschließend einmal mit 200 µl destilliertem Wasser waschen 100 µl Substrat pro Vertiefung pipettieren
Messung	SLT Photometer bei 405-410 nm, Referenzwellenlänge 620 nm: direkt nach Substratzugabe, anschließend Platte abkleben nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C, Platte abkleben nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C
Auswertung	

Testgültigkeit (nach Herstellerangaben)	<p>nach 1 Stunde: Photometer 405 nm</p> <p>Der Test ist gültig, wenn nach Abzug des Substrat-leerwertes der Mittelwert der Kontrollen wie folgt ist:</p> <p>Negativkontrolle: Absorption < 0,05</p> <p>Positivkontrolle: Absorption \geq 0,100</p>
Grenzwertberechnung (nach Herstellerangaben)	<p>Grenzwert (Cutoff) nach 24 Stunden: positiver Cutoff \geq ((2 x mittlere Absorption der Negativkontrollen)+0,080); ist der errechnete Cutoff < 0,1 wird er vom Hersteller mit 0,100 festgelegt.</p>
Interpretation (nach Herstellerangaben)	<p>Photometer 405 nm, nach 24 Stunden</p> <ul style="list-style-type: none"> - positives Ergebnis: Absorption \geq Cutoff - negatives Ergebnis: Absorption < Cutoff - klar positives Ergebnis: Absorption \geq 1,00 - Grauzone: Absorption \geq 0,05 und \leq 0,075 <p>Proben mit einem Ergebnis im Grauzonenbereich werden mit frisch aufbereitetem Material wiederholt. Ist die Absorption in der Wiederholung \geq Cutoff ist die Probe positiv, ist sie < Cutoff ist sie negativ.</p> <p>Kreuzreaktivität: Ist eine Probengruppe stark positiv, reagiert die zweite Probengruppe möglicherweise mit. Die mit reagierende Probengruppe wird wie folgt bewertet:</p> <p>positives Ergebnis = Absorption \geq 75% der stark positiven Gruppe</p> <p>schwach positives Ergebnis = Absorption > 25% bis < 75% der stark positiven Gruppe</p> <p>grenzwertiges Ergebnis = Absorption \leq 25% der stark positiven Gruppe</p>

2.3.2.3. HPV-Nachweis mit Innogenetics INNO-LiPA HPV Genotyping®

Der Innogenetics INNO-LiPA HPV Genotyping® ist ein Test zum Nachweis biotinylierter PCR Produkten. Dazu wird ein Teil der L1 Region des HPV Genoms mittels PCR (Primer SPF10) amplifiziert. Das Amplifikat wird denaturiert und mit genotyp-spezifischen Oligonukleotidsonden hybridisiert, die als parallele Banden auf Nitrozellulosestreifen aufgebracht sind. Am oberen Ende eines jeden Membranstreifens befindet sich eine Kontrollbande, die Konjugatkontrolle. Durch Inkubation mit dem Chromogen BCIP/NBT wird das Hybrid als purpurfarbener Niederschlag sichtbar gemacht und optisch ausgewertet (Abbildung 5). Es lassen sich 25 HPV Genotypen identifizieren.

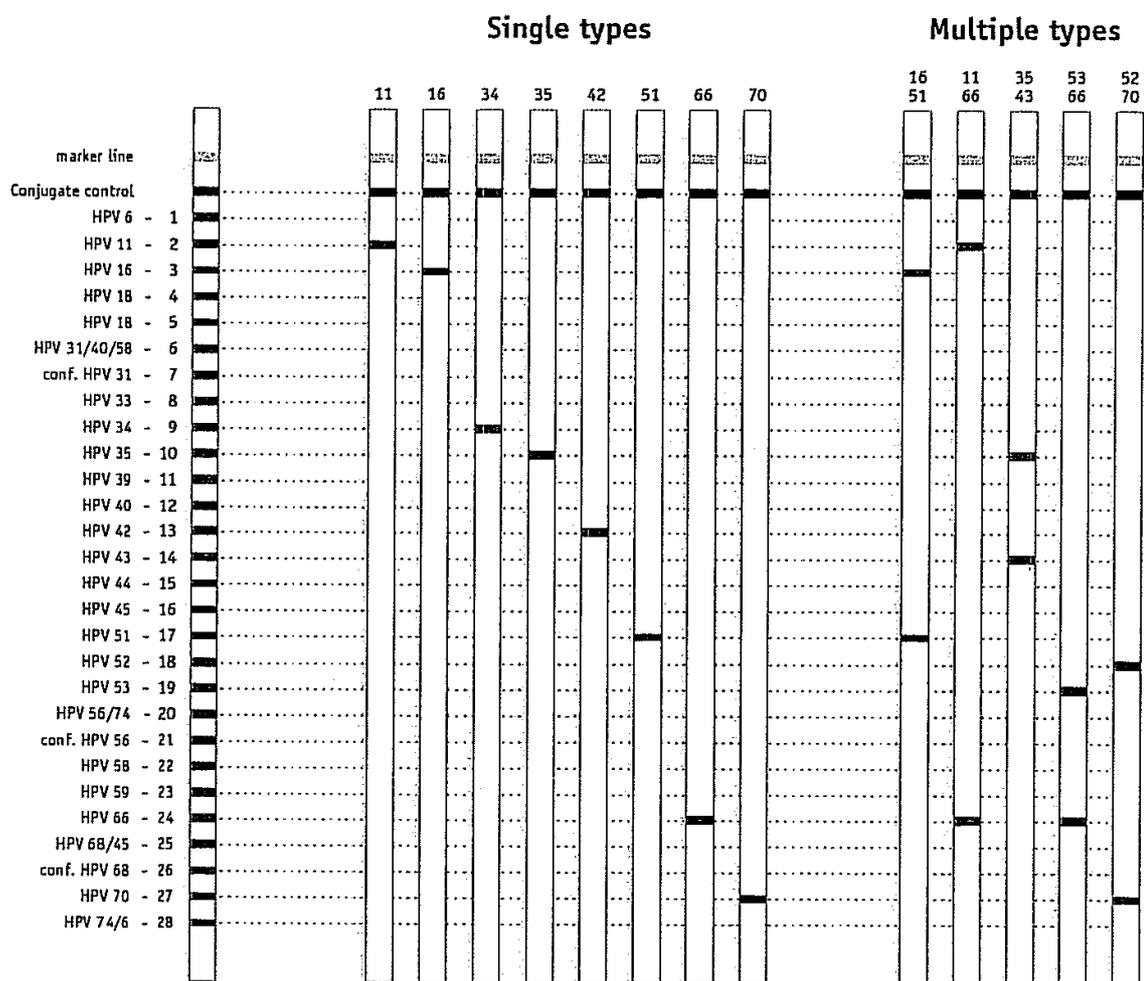


Abbildung 5: Auswertung des INNO-LiPA HPV Genotyping® Tests

[nach Innogenetics 2002]

Tabelle 12: Innogenetics INNO-LiPA HPV Genotyping® – Amplifikation
(nach Herstellerangaben)

VORBEREITUNG	
AMPLIFIKATION	
Amplifikationskasten bestücken	1 Amplifikationsröhrchen je Probe
Herstellung Amplifikationsgemisch	19,66 µl destilliertes Wasser, 5 µl 10x PCR Puffer, 1 µl dNTPs, 10 µl Primermix, 4 µl MgCl ₂ und 0,34 µl Ampli Taq Gold DNS Polymerase (=40 µl) je Probe herstellen
Programmierung Thermocycler	9 Minuten bei 94°C folgen 40 Zyklen: 30 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 52°C, 45 Sekunden bei 72°C und 5 Minuten bei 72°C
Durchführung Amplifikation	10 µl Probe und 40 µl Amplifikationsgemisch in ein Amplifikationsröhrchen pipettieren, verschließen, in den Thermocycler verbringen und Programm starten.

Die Analyse des PCR-Produkts erfolgt mit einem 2%igen Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Zum Größenvergleich wird ein Molekulargewichtsstandard (123bp DNS-Leiter) verwendet.

Tabelle 13: Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

Vorbereitung	
Herstellung TBE-Puffer	50 ml TBE-Puffer, 200 ml destilliertes Wasser, 12,5 µl Ethidiumbromid mischen
Agarose-Gel (2%ig) herstellen	0,8 g Agarose, 40 ml TBE-Puffer im Erlenmeyerkolben mischen in der Mikrowelle aufkochen bis die Agarose vollständig gelöst ist 35 ml Agarose pro Gelkammer einfüllen den Kamm auf eine Gelseite einstecken

	<p>Gel 30 Minuten bei Raumtemperatur fest werden lassen, anschließend 30 Minuten bei 4°C auspolymerisieren lassen</p> <p>Kamm entfernen</p> <p>Gel in Elektrophoresekammer überführen mit 200 ml TBE-Puffer überschichten</p>
Molekulargewichtsstandard (MGS) herstellen	10 µl kommerziellen MGS, 40 µl destilliertes Wasser, 10 µl Migrationsmarker mischen
Positivkontrolle	5 µl Migrationsmarker, 10 µl Positivkontrolle mischen
Proben	5 µl Migrationsmarker, 10 µl Probe mischen
Durchführung	
MGS/Positivkontrolle	5 µl je Öffnung (einmal)
Proben	5 µl je Öffnung
Elektrophorese	60 Minuten bei 70 Volt nach Ende: Gel auf UV-Gerät legen, Photographie: ¼ Sekunde, Blende 8
Auswertung	Die Größe des Amplifikats wird durch Vergleich mit dem MGS bestimmt.
Interpretation	positives Ergebnis: DNS-Fragment von 65bp vorhanden negatives Ergebnis: keine DNS sichtbar

Tabelle 14: Innogenetics INNO-LiPA HPV Genotyping® – Detektion
(nach Herstellerangaben)

VORBEREITUNG	
DETEKTION	
Einstellung Hybridisierungs-Schüttel Wasserbad (HWS)	50°C ± 0,5°C
Erwärmung Hybridisierungslösung	37°C
Erwärmung Stringent Waschlösung	37°C
Waschlösung herstellen	8 ml Waschlösung je Teststreifen im Verhältnis 1:5 Waschkonzentrat mit destilliertem Wasser verdünnen
Konjugat herstellen	2 ml pro Teststreifen im Verhältnis 1:100 Konjugatkonzentrat mit Konjugatverdünnungslösung verdünnen
Substratlösung herstellen	2 ml Substratlösung pro Teststreifen im Verhältnis 1:100 Substratkonzentrat mit Substratpufferlösung verdünnen
DURCHFÜHRUNG	
DETEKTION	
Denaturierung	10 µl Denaturierungsreagenz (DS) in eine Ecke der Inkubationsschale geben und 10 µl Probe in den Tropfen DS mischen; 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
Hybridisierung	2 ml gewärmte Hybridisierungslösung je Inkubationsschale pipettieren einen Membranstreifen je Inkubationsschale hinzugeben 60 Minuten bei 50°C im HWS inkubieren
Waschen	Flüssigkeit absaugen zweimal mit 2 ml Stringent Waschlösung

	<p>je Inkubationsschale für 10-20 Sekunden auf dem Schüttler waschen</p> <p>Waschlösung absaugen</p> <p>2 ml Stringentwaschlösung je Inkubationsschale pipettieren</p> <p>30 Minuten bei 50°C im HWS inkubieren</p>
Konjugat	<p>Flüssigkeit absaugen</p> <p>zweimal mit 2 ml Stringent Waschlösung je Inkubationsschale für 1 Minute auf dem Schüttler waschen</p> <p>Waschlösung absaugen</p> <p>2 ml Konjugat je Inkubationsschale pipettieren</p> <p>30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren</p>
Färbung	<p>Flüssigkeit absaugen</p> <p>zweimal mit 2 ml Waschlösung je inkubationsschale für 1 Minute auf dem Schüttler waschen</p> <p>Waschlösung absaugen</p> <p>2 ml Substratlösung je Teststreifen pipettieren und 1 Minute schwenken</p> <p>Substratlösung absaugen</p> <p>2 ml Substrat je Teststreifen pipettieren,</p> <p>Inkubationsschalen abdecken</p> <p>30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem Schüttler inkubieren</p>
Reaktionsstopp	<p>Substrat absaugen</p> <p>zweimal mit 2 ml destilliertem Wasser je Inkubationsschale</p> <p>3 Minuten auf dem Schüttler waschen</p>
Auswertung	
Testgültigkeit/Kontrolle	<p>Die Konjugatkontrolle ist auf allen Teststreifen eines Testdurchlaufs mit annähernd gleicher Intensität positiv.</p>
Interpretation (Abb. 5)	<p>positives Ergebnis: deutlich sichtbare Banden</p> <p>Zuordnung zu bestimmten HPV-Typen mit Hilfe des INNO-LiPA HPV Genotyping Interpretationsbogens</p> <p>negatives Ergebnis: keine Bande anfärbbar</p>

2.4. Materialverzeichnis

2.4.1. Materialverzeichnis *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae*

2.4.1.1. Technische Geräte

Zentrifuge, 5415C (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Vortex Mixer, Heidolph Reax 2000

LCx[®] Trockenbad (Abbott Laboratories, USA)

LCx[®] Thermocycler (Abbott Laboratories, USA)

LCx[®] Analysegerät (Abbott Laboratories, USA)

2.4.1.2. Chemikalien

Aqua bidestillat

Ethanol

Natriumhypochlorid

2.4.1.3. kommerzielle Testkits

Abbott LCx[®] Chlamydia Trachomatis Assay (Abbott, Wiesbaden)

Inhalt Amplifikationskit :

AmplifikationsgefäÙe (4 Oligonukleotidsonden, DNS-Polymerase, DNS-Ligase, 2 dNTPs in Pufferlösung, gebrauchsfertig), Negative Kontrolle (Lachshoden-DNS in Pufferlösung), Kalibrator (extrahierte DNS aus inaktivierten *C. trachomatis*-Elementarkörperchen in Pufferlösung), Aktivierungsreagenz ($MgCl_2$ in Pufferlösung)

Inhalt Detektionsreagenzienpackung :

1 Flasche Anti-Capture-Hapten beschichtete Mikropartikel in Pufferlösung (gebrauchsfertig), 1 Flasche Anti-Detektions-Hapten gebunden an Alkalische Phosphatase-Konjugat in Pufferlösung (gebrauchsfertig), 1 Flasche 4-Methylumbelliferyl-Phosphat in Pufferlösung (gebrauchsfertig), 1 Flasche Metallchelat in Pufferlösung (gebrauchsfertig)

Abbot LCx[®] Neisseria Gonorrhoeae Assay (Abbott, Wiesbaden)

Inhalt Amplifikationskit :

AmplifikationsgefäÙe (4 Oligonukleotidsonden, DNS-Polymerase, DNS-Ligase, dNTP in Pufferlösung, gebrauchsfertig), Negative Kontrolle (Lachshoden-DNS in

Pufferlösung), Kalibrator (extrahierte N.Gonorrhoeae DNS in Pufferlösung), Aktivierungsreagenz ($MgCl_2$ in Pufferlösung, gebrauchsfertig)

Inhalt Detektionsreagenzienpackung :

1 Flasche mit anti-Capture-Hapten beschichtete Mikropartikel in Pufferlösung (gebrauchsfertig), 1 Flasche mit anti-Detektions-Hapten gebunden an alkalische Phosphatase in Pufferlösung (gebrauchsfertig), 1 Flasche 4-Metylumbelliferyl-Phosphat in Pufferlösung (gebrauchsfertig), 1 Flasche Metallchelate in Pufferlösung (gebrauchsfertig)

LCx[®] Kit zur Vorbereitung von Urinproben (Abbott, Wiesbaden)

LCx[®] Inaktivierungsverdünnungsmittel (Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung, gebrauchsfertig) (Abbott, Wiesbaden)

LCx[®] Systemverdünnungsmittel (TRIS-Acetat-Puffer, gebrauchsfertig) (Abbott, Wiesbaden)

LCx[®] Reaktionszellen (Abbott, Wiesbaden)

2.4.1.4. Kleingeräte und Materialien

Mikropipette 100 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Mikropipette 1000 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Mikro-Schraubröhrchen 1,5 ml, steril (Sarstedt AG & Co, Nürnberg)

2.4.2. Materialverzeichnis HPV

2.4.2.1. Technische Geräte

Heizblock, 1202 (SKS-Biomedical Instruments, Luton, England)

MS2 Minishaker (Fisher Scientific GmbH, Willington)

Zentrifuge 2K15 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk USA)

Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau)

Waschgerät, Tecan SLT Columbus 404370 (SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim)

Micro-Shaker, Mikrotiter Dynatech

SLT-Photometer, (SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim)

Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau)

Hybridisierungs-Schüttel Wasserbad, GFL®
Vakuumpumpe (Inotech Ag, Dottikon, Schweiz)
Schüttler (Hoefer Scientific Instruments San Francisco, USA)
Mikrowelle ER-7825W (Toshiba)
Waage Typ 1544 (Sartorius GmbH, Göttingen)

2.4.2.2. Chemikalien

Ethanol 96% - 100% (Merck)
TE-Puffer
Wasser DNase-/RNasefrei (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Magnesiumchlorid (Applied Biosystems, Darmstadt)
PCR - Puffer (10-fach) (Applied Biosystems, Darmstadt)
Desoxyribonukleotid-Trisphosphate (dNTPs) (Amersham Pharmacia Biotech-Europe GmbH, Freiburg)
Triton X-100 / Tween 20
12-Ampli-Taq-DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Darmstadt)
AmpliTaq Gold DNS Polymerase (PE-Biosystems Deutschland GmbH, Weiterstadt)
Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Agarose low Gel Temperature (Bio Rad-Laboratories, München)
Migrationsmarker (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellkirchen)
Molkulargewichtsstandard (123 Basenpaare) (BRL Life Technologie GmbH, Eggenstein)
HPV Typ 18 Extraktionskontrolle (American Type Culture Collection, Rockville Maryland, USA)

2.4.2.3. kommerzielle Testkits

QIAamp® DNS Minikit (Qiagen GmbH, Hilden)

Inhalt :

QIAamp Zentrifugationssäulen (mit Silikamembran),
Aufbewahrungsröhrchen (2ml), Puffer AL (gebrauchsfertig), Puffer ATL
(gebrauchsfertig), Pufferkonzentrat AW1, Pufferkonzentrat AW2, Elutionspuffer
(gebrauchsfertig), Proteinase K (gebrauchsfertig)

Digene Sharp Signal[®] System (Digene, USA)

Inhalt des HPV Sonden/Primer Set :

HPV Primer MY09 (25 pmol/µl unbiotinyliert), HPV Primer MY11 (25 pmol/ml 5'Ende biotinyliert), HPV RNA Probe A (komplementär dem biotinylierten Strang des PCR Produktes in Pufferlösung; HPV Typen 6, 11, 42, 43, 44), HPV RNA Probe B (komplementär dem biotinylierten Strang des PCR Produktes in Pufferlösung; HPV Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58), HPV Positivkontrolle A (HPV Typ 6; gebrauchsfertig), HPV Positivkontrolle B (HPV Typ 16; gebrauchsfertig)

Inhalt des Testkits :

Negativkontrolle (gebrauchsfertig), Sondenverdünnungsmittel (gebrauchsfertig), Probenverdünnungsmittel (gebrauchsfertig), Denaturierungsreagenz, Mikrotiterplatte (mit streptavidinbeschichteten Mikrotiterstreifen), Waschpuffer, Detektionsreagenz (Anti-RNA : DNS -alkalische Phosphatase, gebrauchsfertig), Substratkonzentrat (50-fach-Konzentrat Para-Nitrophenylphenol (PNPP)), Substratverdünnungslösung (Diethanolamin, gebrauchsfertig)

INNO-LiPA HPV Genotyping[®] (Innogenetics N.V., Belgien)

Inhalt :

Primer Mix (SPF10 Primer), INNO-LiPA HPV Teststreifen, Denaturierungslösung (alkalische Lösung mit EDTA), Hybridisierungslösung (gebrauchsfertig), Stringent Waschlösung (gebrauchsfertig), Konjugatkonzentrat (100-fach-Konzentrat, Streptavidin-Alkalische-Phosphatase), Konjugatverdünnungslösung, Substratlösung (100-fach-Konzentrat Bromochloroindolylphosphat und Nitroblue Tetrazolium), Substratpuffer, Waschlösung, Inkubationsschalen, Interpretationsdiagramm, Dokumentationsbogen

2.4.2.4. Kleingeräte und Materialien:

Mikropipette 20 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Mikropipette 100 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Mikropipette 200 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Mikropipette 1000 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Multipipette (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Biopur Combitip 0,5 ml (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Biopur Combitip 5 ml (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Biopur Combitip 12,5 ml (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

Micro Amp Reaction Tubes (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt)

Micro Amp Caps (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt)

Micro Amp Tube Tray Retrainer (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt)

konische Röhrchen 50 ml, steril (Becton Dickinson Labware, USA)

konische Röhrchen 2 ml, steril (Biozym Diagnostik GmbH, Österreich)

Erlenmeyerkolben 500 ml (Schott GmbH, Deutschland)

Becherglas 250 ml (Schott GmbH, Deutschland)

Messbecher 250 ml (Hirschmann, Deutschland)

Waage Typ 1544 (Sartorius GmbH, Göttingen)

Mini Submerine Agarose Gel Unit, HE 33 (Hoeffer Scientific Instruments San Francisco, USA)

PS 250/2,5 Amph.Transphor Elektrophorese Gerät (Hoeffer Scientific Instruments San Francisco, USA)

Gelkammer

Kamm

Transluminator UVP inc. (Atlanta Chemie- und Handels GmbH, Heidelberg)

Polaroidkamera DS34

Polaroidfilm (Serva T 667 ISO 3000)

2.5. Statistische Auswertung

2.5.1. Datenerfassung

Die bei den labormedizinischen Untersuchungen erhobenen Daten wurden in Microsoft Excel[®] Tabellen festgehalten.

Die Daten zum Alter, Familienstand, monatlichen Haushaltseinkommen, Bildungsstand und Lebensraum wurden von der leitenden Gynäkologin der Studie in Form von Excel[®] Tabellen übermittelt. Zur statistischen Auswertung wurden qualitativen Variablen Ordinalzahlen zugeordnet: Beispielsweise niedriger Bildungsstand = 0, hoher Bildungsstand = 1.

2.5.2. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS Version 10 für Windows.

Die statistische Analyse der demographischen und sozioökonomischen Charakteristika der Studienteilnehmerinnen erfolgte deskriptiv (Vergleich von relativen Häufigkeiten), ebenso die der Prävalenz der STDs. Zusätzlich zu den Prozentzahlen wurden die 95% Konfidenzintervalle bestimmt. Zum Vergleich von relativen Häufigkeiten wurde der Chi-Quadrat Test angewendet. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Zur Ermittlung der Risikofaktoren für die Präsenz einer Infektion wurde mittels univariater Analyse die Odds Ratio (OR) und das zugehörige 95% Konfidenzintervall bestimmt. Die Odds Ratio ist dabei das Maß für die Größe des Unterschiedes zwischen zwei Gruppen und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine unabhängige Variable (beispielsweise das Geschlecht) mit einer abhängigen Variablen (beispielsweise Präsenz von *C. trachomatis* in der Lavage) assoziiert ist. Eine OR = 1 bedeutet, dass kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht.

Das 95%-Konfidenzintervall beschreibt den Bereich, in dem der tatsächliche Messwert der Odds Ratio mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt.

3 Ergebnisse

3.1. Demographische und sozioökonomische Charakteristika

Im Rahmen der Studie wurden von 412 Frauen zwischen 12 und 49 Jahren mit einem Wohnsitz in der Stadt und 322 Frauen aus den Weilern demographische, sozioökonomische und für die reproduktive Gesundheit relevante Daten erhoben. Von diesen 734 Frauen waren 63 Frauen aus der Stadt und 79 Frauen aus den ländlichen Gebieten noch nicht sexuell aktiv, so dass sich die Studienpopulation auf 592 Frauen reduzierte. Von 582 der 592 Studienteilnehmerinnen standen Zervikallavagen zur Untersuchung auf HPV, *N. gonorrhoeae* und *C. trachomatis* zur Verfügung.

Zwei dieser Frauen wurden nachträglich aus der Studie ausgeschlossen, da die demographischen und sozioökonomischen Daten fehlten. Somit waren Laborergebnisse von 580 Frauen für die Auswertung vorhanden.

In Tabelle 15 wurden die demographischen und sozioökonomischen Charakteristika der Studienteilnehmerinnen, bezogen auf den jeweiligen Lebensraum dargestellt. Die Studienteilnehmerinnen wurden nach ihrem Wohnsitz in zwei Gruppen zusammengefasst. Die Frauen mit einem Wohnsitz im Stadtgebiet zählten zur Gruppe "Stadt", die in den Weilern lebenden zur Gruppe "Land".

Tabelle 15: Demographische und sozioökonomische Charakteristika der Studienteilnehmerinnen unterteilt nach Lebensraum

		Lebensraum		n Gesamt	p - Wert
		Stadt n (%)	Land n (%)		
Alter	≤ 20 Jahre	43/349 (12,3 %)	47/243 (19,3 %)	90	0,02
	> 20 Jahre	306/349 (87,7 %)	196/243 (80,7 %)	502	
	Median	31 Jahre	32 Jahre		0,7
	Interquartil Abstand	25-38 Jahre	23-39 Jahre		

Fortsetzung Tabelle 15 von Seite 42

		Lebensraum			
		Stadt n (%)	Land n (%)	n Gesamt	p - Wert
Familienstand	alleinstehend	89/349 (25,5 %)	62/243 (25,5 %)	151	
	Partnerschaft	260/349 (74,5 %)	181/243 (74,5 %)	441	1,0
Bildungsstand	Niedrig*	125/339 (36,9 %)	192/242 (79,3 %)	317	< 0,001
	Hoch*	214/339 (63,1 %)	50/242 (20,7 %)	264	
Haushalts- einkommen	< 2 staatliche Mindestlöhne *	238/339 (70,2 %)	208/242 (86,0 %)	446	< 0,001
	≥ 2 Staatliche Mindestlöhne	101/339 (29,8 %)	34/242 (14,0 %)	135	
Haushaltsgröße	≤ 5 Personen	247/339 (72,9 %)	152/242 (62,8 %)	399	0,01
	> 5 Personen	92/339 (27,1 %)	90/242 (37,2 %)	182	

* niedriger Bildungsstand: Analphabeten bzw. weniger 8 Jahre schulische Bildung

* hoher Bildungsstand: mindestens 8 Jahre schulische Bildung

* ein staatlicher Mindestlohn betrug zum Zeitpunkt der Untersuchung rund 80 US \$ im Monat

Der Anteil der jugendlichen Studienteilnehmerinnen im Lebensraum Land war signifikant höher als der Anteil, der in der Stadt lebenden Teilnehmerinnen ($p = 0,02$).

Der Altersdurchschnitt (Median) der beiden Gruppen lag bei 31 Jahre bzw. 32 Jahre; auch die Interquartil-Abstände zeigten, dass beiden Gruppen ein ähnliches Alter hatten. Im Vergleich Stadt und Land ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppen der alleinstehenden Frauen und denen in eine Partnerschaft lebenden

Frauen ($p = 1$). Der Anteil der in einer Partnerschaft lebenden Frauen (verheiratet; eheähnliche Verhältnisse) war ungefähr dreimal so hoch wie der Anteil der allein-stehenden Frauen (ledig, verwitwet, geschieden).

Sowohl beim Bildungsstand als auch beim monatlichen Haushaltseinkommen waren signifikante Unterschiede zwischen den Teilnehmerinnen aus Stadt und Land zu erkennen. Während im städtischen Bereich 63,1% der Frauen mindestens acht Jahre schuli-sche Ausbildung abgeschlossen hatten, traf dies nur auf 20,7% der Frauen aus dem ländlichen Bereich zu ($p = < 0,001$).

Der Anteil der Frauen, deren Familien mindestens zwei staatliche Mindestlöhne pro Monat zur Verfügung hatten, lag im städtischen Bereich rund doppelt so hoch, wie im ländlichen. Dabei war zu beachten, dass in beiden Bereichen der Anteil der extrem armen Haushalte (< 2 staatlicher Mindestlohn) überwog. Sowohl in der Stadt, als auch auf dem Land lebte der Großteil der Frauen in Haushalten mit maximal fünf Personen.

3.2. Laborergebnisse der HPV-Analyse

119 von 580 Proben (20,5%) wurden mit dem Digene SHARP Signal[®] Test (HCII) positiv auf HPV-spezifische DNS getestet (Abbildung 6). Davon zeigten 69 Proben ein klar positives Ergebnis (Absorption $\geq 1,00$) und gingen direkt in den Innogenetics-Test (INNO-LiPA HPV Genotyping[®]) ein. Weitere 50 Proben zeigten ein schwach positives Ergebnis (Absorption $> \text{Cutoff} < 1,00$) und wurden mit dem HCII-Test wiederholt. Von diesen waren 22 erneut positiv und gingen in den INNO-LiPA Test ein. Insgesamt wurden 91 der 119 im HCII-Test positiven Proben (76,5%) in der INNO-LiPA PCR untersucht. 68 dieser Proben zeigten ein Amplifikat in der Elektrophorese und erbrachten bei der Detektion durch INNO-LiPA ein positives Ergebnis. Von den 23 elektro-phorese-negativen Proben waren 20 bei der ersten HCII Testung als klar positiv getes-tet worden. Nur drei von ihnen hatten in der Wiederholungsuntersuchung ein positives Resultat gezeigt.

Bei 68 der ursprünglich 119 HPV-positiven (HCII-Test) Studienteilnehmerinnen (57,1%) ließ sich eine Infektion mit mindestens einem HPV-Genotyp nachweisen. Bei 24 dieser 68 war eine Infektion mit mehreren Genotypen vorhanden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungsergebnisse des INNO-LiPA Tests als Grundlage für die Präsenz einer HPV Infektion verwendet.

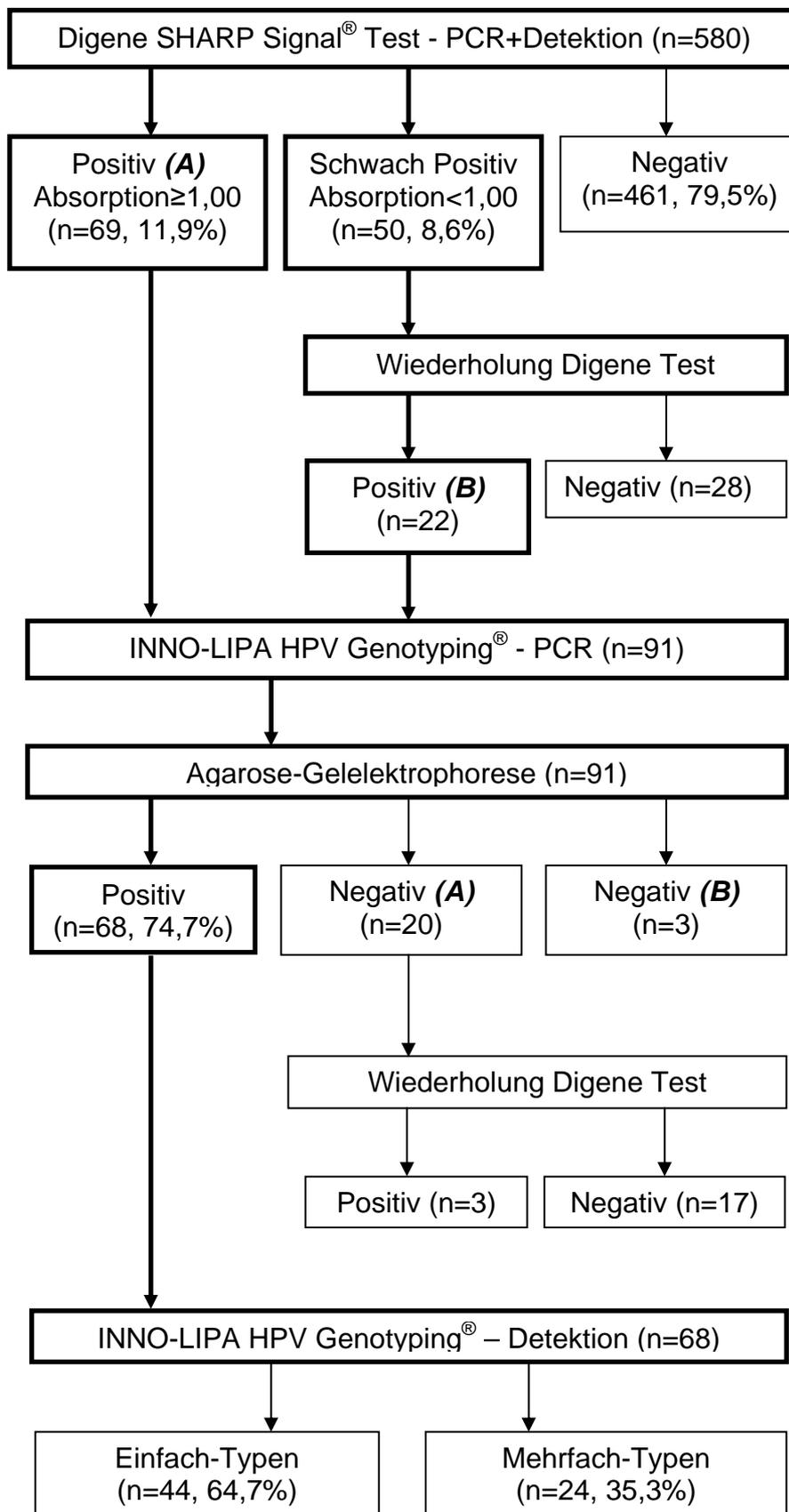


Abbildung 6: Ablaufdiagramm der HPV-Analyse

Legende: A = Proben, die im ersten HCII-Test ein klar positives Ergebnis zeigten,
B = Proben, die vor dem INNO-LiPA Test mit dem HCII-Test wiederholt worden waren.

3.3. Prävalenz der sexuell übertragbaren Krankheiten (STD)

93 der 580 Frauen (16%) hatten eine oder mehrere sexuell übertragbare Krankheiten. Die mit Abstand häufigste Infektion war HPV (11,7%), gefolgt von Infektionen mit *C. trachomatis* (4,5%) und *N. gonorrhoeae* (1,7%) (Tabelle 16). 11 Frauen (1,9%) waren zweifach infiziert. Davon waren 6 Frauen (54,5%) mit HPV und *C. trachomatis*, 3 Frauen (27,3%) mit HPV und *N. gonorrhoeae* und 2 Frauen (18,2%) mit *N. gonorrhoeae* und *C. trachomatis* infiziert. Keine Frau war mit allen drei Krankheitserregern infiziert.

Tabelle 16: Prävalenz der STD bei den Frauen der Studienpopulation (n=580)

STD	Anzahl der positiv getesteten	% (KI 95%)*
HPV	68	11,7% (9,1-14,4)
<i>C. trachomatis</i>	26	4,5% (2,8-6,2)
<i>N. gonorrhoeae</i>	10	1,7% (0,7-2,8)
Frauen mit mind. einer STD	93	16,0% (13,0-19,0)
Frauen mit zwei STD	11	1,9% (0,8-3,0)

*95% KI \cong 95 prozentiges Konfidenzintervall

Die Präsenz von mindestens einer STD bei Frauen in der Stadt (16,5%), und auf dem Land (15,4%) war ähnlich ($p=0,7$), wie Abbildung 7 zu entnehmen ist. In beiden Lebensräumen war die Prävalenz von HPV am höchsten. Es zeichnete sich ein deutlicher Trend in der Prävalenz zwischen Stadt und Land (13,6% zu 9,0%) ab, der allerdings nicht signifikant war ($p = 0,1$). Sowohl in der Stadt als auch auf dem Land waren Infektionen mit *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* nachweisbar. Dabei war eine signifikant höhere Anzahl von Chlamydieninfektionen auf dem Land (7,3%), im Vergleich zur Stadt (2,6%) zu verzeichnen ($p = 0,01$).

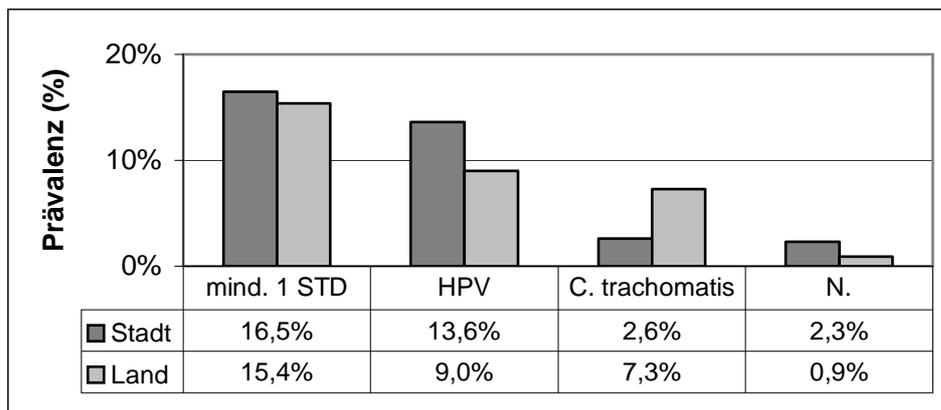


Abbildung 7: Prävalenz der STD, aufgeteilt nach dem Lebensraum

Es zeigte sich, dass die Prävalenz der Frauen mit mindestens einer STD mit zunehmendem Lebensalter bis zur Altersgruppe 31 bis 40 Jahre (von 30,6% auf 8,7%) abnahm und dann auf ähnlich hohem Niveau verblieb (Abbildung 8). Entsprechendes galt für die Häufigkeit einer Infektion mit HPV (22,4% auf 6,3%) und *C. trachomatis* (9,4% auf 1,9%). Die Infektionshäufigkeit mit *N. gonorrhoeae* dagegen nahm bis zur Altersgruppe der 21 bis 30 jährigen Frauen ab (2,4% auf 0,5%), stieg dann aber bis zur Gruppe der 41 bis 50 jährigen wieder an (von 0,5% auf 2,9%).

Die Prävalenz des Vorliegens von mindestens einer STD, aber auch einer Monoinfektion mit HPV oder *C. trachomatis*, schwankte signifikant zwischen den Altersgruppen, mit einer Tendenz der Abnahme der Prävalenz im höheren Lebensalter (Tabelle 17). Eine signifikante Abnahme der Prävalenz zeigte sich beim Vergleich der jüngsten Altersgruppe mit den 31 bis 40 jährigen und 41 bis 50 jährigen Frauen, aber auch beim Vergleich der 21 bis 30 jährigen mit den 31 bis 40 jährigen Frauen. Die Zahl der Infektionen mit *N. gonorrhoeae* war zu gering, um einen signifikanten Trend erkennen zu können.

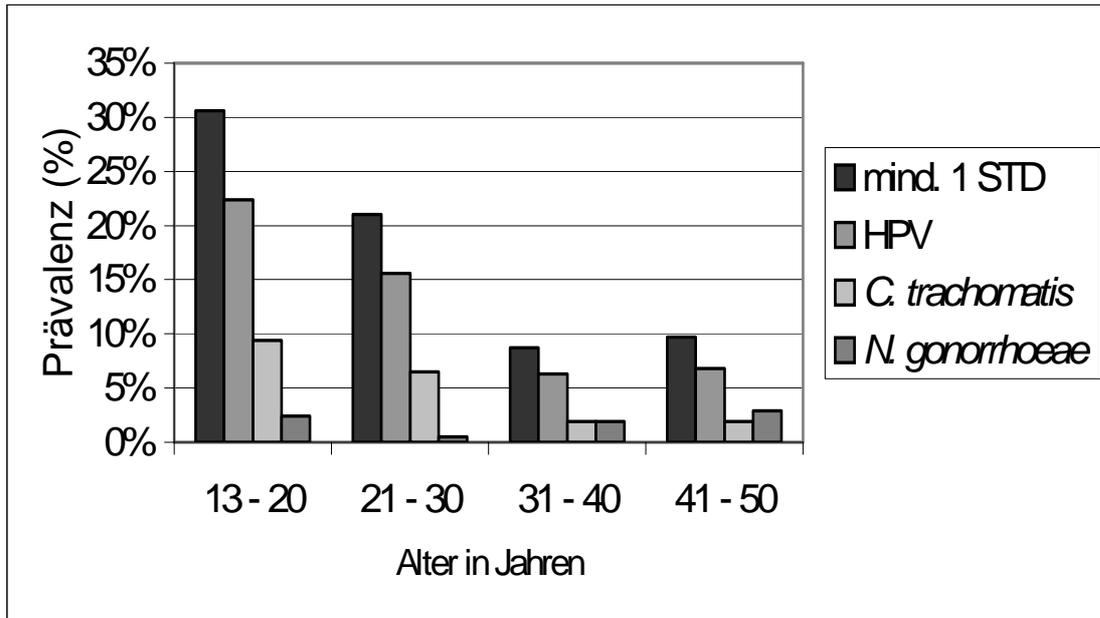


Abbildung 8: Darstellung der Prävalenz in Abhängigkeit vom Alter

Tabelle 17: Zusammenhang von Prävalenz und Lebensalter (Chi-Quadrat Test)

	Vergleich der Altersgruppen						
	alle	1 und 2	1 und 3	1 und 4	2 und 3	2 und 4	3 und 4
mind. 1 STD	< 0,001	0,9	< 0,001	< 0,001	0,001	0,02	0,8
HPV	< 0,001	0,2	< 0,001	0,002	0,003	0,03	0,9
<i>C. trachomatis</i>	0,01	0,4	0,004	0,02	0,02	0,09	1
<i>N. gonorrhoeae</i>	0,5	0,2	0,8	0,8	0,2	0,1	0,6

alle = Vergleich Altersgruppen 1, 2, 3 und 4

1 = 13 bis 20 Jahre

2 = 21 bis 30 Jahre

3 = 31 bis 40 Jahre

4 = 41 bis 50 Jahre

3.3.1. HPV-Genotypen

Bei 44 der 68 HPV-infizierten Frauen (65%) war nur ein HPV-Genotyp nachweisbar. Rund 26% waren mit zwei Genotypen, 5% mit drei Genotypen und 3% mit vier Genotypen infiziert (Tabelle 18). Am häufigsten traten Infektionen mit den Genotypen 16, 31 und 74 auf (jeweils 10 Frauen), gefolgt von Infektionen mit Typ 6, 51, 52, 18 und 58 (neun, acht, acht, sieben und sieben Frauen) (Abbildung 9).

Einige Genotypen kamen nur ein oder zweimal vor (11, 44, 45, 68, 70).

Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Frauen und der Infektion mit einem bestimmten Genotyp erkennen. Auch ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Infektion mit einem bestimmten Genotyp und einer gleichzeitigen Infektion mit *C. trachomatis* bzw. *N. gonorrhoeae* erkennen.

Tabelle 18: HPV-Infektionen unterteilt nach Genotypen

HPV	Anzahl der Infizierten	Anzahl der Genotyp positiven	%
nur ein Genotyp	68	44	64,7%
zwei Genotypen	68	18	26,5%
drei Genotypen	68	4	5,9%
vier Genotypen	68	2	2,9%

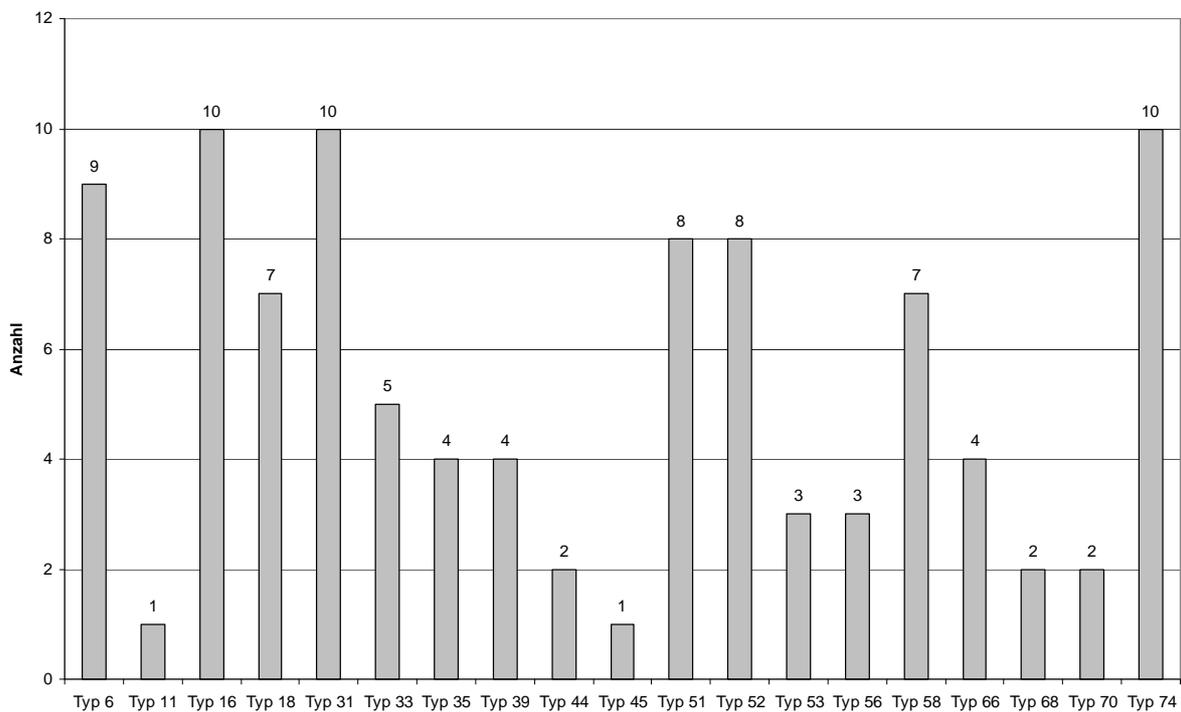


Abbildung 9: Vorkommen von HPV-Genotypen bei den Frauen der Studienpopulation

Es zeigte sich, dass die Kombination der Genotypen 6 und 74 mit achtmal die Häufigste war. Insgesamt war Typ 74 15 Mal und Typ 6 14 Mal in Kombination mit einem anderen Genotyp nachweisbar (Abbildung 10). Auch in der Gesamthäufigkeit der Genotypen innerhalb der Studienpopulation befanden sich HPV 74 und HPV 6 unter den vier am häufigsten vertretenen Genotypen (Abbildung 9). Die übrigen Genotypen traten lediglich ein bis zweimal in Kombination auf. Der Genotyp 16, der 10 Mal in der Studienpopulation vertreten war, wurde nur zweimal in Kombination gefunden. Der Typ 31, der ebenfalls 10 Mal in der Studienpopulation gefunden wurde, trat dagegen siebenmal in Kombination auf. Dagegen war der Typ 53, der nur dreimal in der Population nachweisbar war, sechsmal in Kombination vertreten.

6	11	16	18	31	33	35	39	44	45	51	52	53	56	58	66	68	70	74		Summe	
x				1		1					1	1		1		1		8	6	14	
	x	1																		11	1
		x				1														16	2
			x	1						1	1		2	1						18	6
				x						1	1		2	1						31	7
					x										2					33	2
						x					1							1		35	4
							x					1						1		39	2
								x												44	0
									x											45	0
										x	1									51	3
											x							1	1	52	4
												x			1			1		53	6
													x			1		2		56	4
														x						58	5
															x					66	5
																x		1		68	3
																	x			70	1
																		x		74	15

Abbildung 10: Matrix des kombinierten Auftretens von HPV-Genotypen in der Studienpopulation

Hinsichtlich der Verteilung von high-risk und low-risk-Genotypen innerhalb der Gruppe der HPV-infizierten Frauen (n=68) zeigte sich, dass 72% der Frauen (n=49) mit high-risk HPV infiziert waren; nur 13% hatten eine Infektion mit low-risk HPV. Bei 14% der Frauen ließ sich eine Mischinfektion mit high-risk- und low-risk Typen nachweisen.

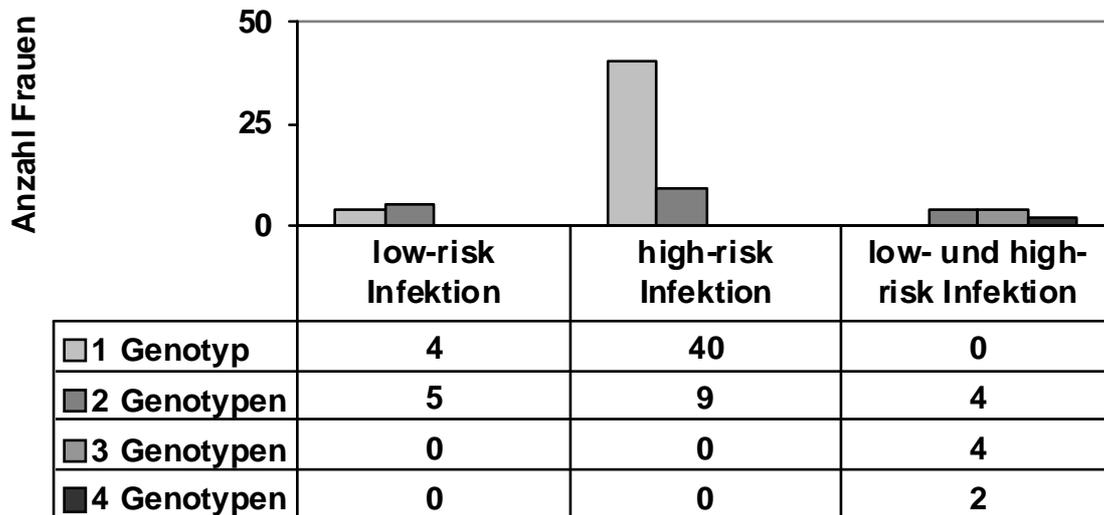


Abbildung 11: Verteilung der HPV-Genotypen in der Gruppe HPV-infizierter Frauen (n=68)

3.4. Risikofaktoren für STD

Abbildung 8 zeigt, dass mit zunehmendem Alter das Risiko an STDs abnahm. Um die verschiedenen Risikofaktoren quantitativ zu erfassen, wurde die Odds Ratio bestimmt (Tabelle 19).

Bei den Frauen (≤ 20 Jahre) war das Risiko der Präsenz mindestens einer STD nahezu dreimal so hoch wie bei älteren Frauen (OR = 2,82; $p = < 0,001$). Kein signifikanter Unterschied war für die Risikofaktoren Lebensraum, Bildungsstand und Haushaltsgröße nachweisbar.

Alleinstehende Frauen hatten tendenziell häufiger eine STD als Frauen, die in einem eheähnlichen Verhältnis lebten oder verheiratet waren (OR = 1,39). Der Unterschied war allerdings nicht signifikant.

Alle anderen Variablen waren nicht mit der Präsenz mindestens einer STD assoziiert.

Tabelle 19: Demographische und sozioökonomische Risikofaktoren für die Präsenz mindestens einer STD (univariate Analyse)

	n Gesamt	STD (%)	OR (95% KI)	p-Wert
Lebensraum				
Stadt	346	57 (16,5%)	Referenz	
Land	234	36 (15,4%)	0,92 (0,59-1,45)	0,7
Alter				
≤ 20 Jahre	85	26 (30,6%)	2,82 (1,66-4,78)	< 0,001
> 20 Jahre	495	67 (13,5%)	Referenz	
Familienstand				
alleinstehend	143	29 (20,3%)	1,39 (0,93–2,1)	0,1
Partnerschaft	437	64 (14,6%)	Referenz	
Bildungsstand				
niedrig	309	50 (16,2%)	Referenz	
hoch	260	43 (16,5%)	1,03 (0,66-1,6)	0,9
Familieneinkommen				
< 2 staatlichen Mindestlöhnen	436	75 (17,2%)	Referenz	
≥ 2 staatlichen Mindestlöhnen	133	18 (13,5%)	0,75 (0,43-1,31)	0,3
Haushaltsgröße				
≤ 5 Personen	391	61 (15,6%)	Referenz	
> 5 Personen	178	32 (18,0%)	1,19 (0,74-1,88)	0,5

OR = Odds Ratio, KI = Konfidenzintervall

Führte man die Risikofaktoranalyse für eine bestimmte STD durch, so ergab sich ein anderes Muster.

Da HPV die häufigste Erkrankung war, war hier ein klares Risikofaktormuster zu erwarten (Tabelle 20). Das Lebensalter war ein hochsignifikanter Risikofaktor für die Präsenz einer Infektion mit HPV. Jüngere Frauen bis 20 Jahre zeigten ein dreifach höheres Risiko für eine Infektion mit HPV als ältere Frauen (OR = 2,62; p = 0,001).

Alleinstehende Frauen hatten ein 1,5 fach höheres Risiko für eine Infektion als verheiratete Frauen (OR = 1,56). Die Odds Ratio war leicht über der Signifikanzgrenze. Die anderen Variablen stellten keinen Risikofaktor dar.

Tabelle 20: Demographische und sozioökonomische Risikofaktoren für die Präsenz von HPV (univariate Analyse)

	n Gesamt	HPV (%)	OR (95% KI)	p-Wert
Lebensraum				
Stadt	346	47 (13,6%)	Referenz	0,1
Land	234	21 (9,0%)	0,63 (0,36-1,08)	
Alter				
≤ 20 Jahre	85	19 (22,4%)	2,62 (1,45-4,72)	0,001
> 20 Jahre	495	49 (9,9%)	Referenz	
Familienstand				
alleinstehend	143	23 (16,1%)	1,56 (0,99–2,5)	0,06
Partnerschaft	437	45 (10,3%)	Referenz	
Bildungsstand				
niedrig	309	34 (11,0%)	Referenz	0,5
hoch	260	34 (13,1%)	1,22 (0,73-2,02)	
Familieneinkommen				
< 2 staatlichen Mindestlöhnen	436	52 (11,9%)	Referenz	1,0
≥ 2 staatlichen Mindestlöhnen	133	16 (12,0%)	1,01 (0,56-1,84)	
Haushaltsgröße				
≤ 5 Personen	391	48 (12,3%)	Referenz	0,7
> 5 Personen	178	20 (11,2%)	0,91 (0,52-1,58)	

OR = Odds Ratio, KI = Konfidenzintervall

Frauen, die auf dem Land lebten, hatten ein dreifach höheres Risiko für eine Infektion mit *C. trachomatis* (Tabelle 21) als die in der Stadt lebenden Frauen (OR = 2,93; $p = 0,01$). Frauen jünger als 20 Jahre hatten ein dreifach höheres Risiko als ältere Frauen (OR = 2,75; $p = 0,02$); möglicherweise sogar ein siebenfach höheres Risiko (95%KI = 1,16-6,55). Die Größe des Haushalts schien ebenfalls ein Risikofaktor zu sein (OR = 1,95), allerdings war die Odds Ratio nicht relevant ($p = 0,09$).

Tabelle 21: Demographische und sozioökonomische Risikofaktoren für die Präsenz von *C. trachomatis* (univariate Analyse)

	n Gesamt	<i>C. trachomatis</i> (%)	OR (95% KI)	p-Wert
Lebensraum				
Stadt	346	9 (2,6%)	Referenz	
Land	234	17 (7,3%)	2,93 (1,29-6,7)	0,01
Alter				
≤ 20 Jahre	85	8 (9,4%)	2,75 (1,16-6,55)	0,02
> 20 Jahre	495	18 (3,6%)	Referenz	
Familienstand				
alleinstehend	143	8 (5,6%)	1,36 (0,6–3,06)	0,5
Partnerschaft	437	18 (4,1%)	Referenz	
Bildungsstand				
niedrig	309	15 (4,9%)	Referenz	
hoch	260	11 (4,2%)	0,87 (0,39-1,92)	0,7
Familieneinkommen				
< 2 staatlichen Mindestlöhnen	436	23 (5,3%)	Referenz	
≥ 2 staatlichen Mindestlöhnen	133	3 (2,3%)	0,41 (0,12-1,4)	0,1
Haushaltsgröße				
≤ 5 Personen	391	14 (3,6%)	Referenz	
> 5 Personen	178	12 (6,7%)	1,95 (0,88-4,3)	0,09

OR = Odds Ratio, KI = Konfidenzintervall

Die Gesamtzahl der an *N. gonorrhoeae* erkrankten Frauen war mit 10 zu gering, um eine aussagefähige Risikofaktoranalyse erwarten zu können.

Allerdings zeigte sich auch hier ein erhöhtes Risiko (OR = 1,47; 95%KI = 0,31-7,03) für eine Infektion bei jungen Frauen (Tabelle 22).

Tabelle 22: Demographische und sozioökonomische Risikofaktoren für die Präsenz von *N. gonorrhoeae* (univariate Analyse)

	n Gesamt	<i>N. gonorrhoeae</i> (%)	OR (95% KI)	p-Wert
Lebensraum				
Stadt	346	8 (2,3%)	Referenz	
Land	234	2 (0,9%)	0,36 (0,08-1,73)	0,2
Alter				
≤ 20 Jahre	85	2 (2,4%)	1,47 (0,31-7,03)	0,6
> 20 Jahre	495	8 (1,6%)	Referenz	
Familienstand				
alleinstehend	143	3 (2,1%)	1,3 (0,34–5,0)	0,7
Partnerschaft	437	7 (1,6%)	Referenz	
Bildungsstand				
niedrig	309	7 (2,3%)	Referenz	
hoch	260	3 (1,2%)	0,5 (0,13–1,97)	0,3
Familieneinkommen				
< 2 staatlichen Mindestlöhnen	436	10 (2,3%)		0,08
≥ 2 staatlichen Mindestlöhnen	133	0		
Haushaltsgröße				
≤ 5 Personen	391	7 (1,8%)	Referenz	
> 5 Personen	178	3 (1,7%)	0,94 (0,24-3,68)	0,9

OR = Odds Ratio, KI = Konfidenzintervall

4. Diskussion

Sexuell übertragbare Krankheiten (STDs) stellen in den Entwicklungsländern ein erhebliches gesundheitliches Problem dar [WHO 2001]. Allerdings fehlen häufig zuverlässige Daten, anhand derer die Gesundheitsbehörden Kontroll- und Präventionsmaßnahmen planen können.

So gibt es in Brasilien Prävalenzdaten meist nur für bestimmte Personengruppen wie Besuchern von STD-Kliniken, HIV-Patienten oder Gefängnisinsassen [Miranda et al.2000, Levi et al.2002, Cook et al.2004]. Daten von solchen Risikogruppen sind aber nicht für die weibliche Bevölkerung repräsentativ und erlauben keine Schlussfolgerungen über die Häufigkeit von STDs in einer Population.

Für Frauen aus ländlichen Gegenden gibt es so gut wie keine populationsbasierten Studien.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb mit Hilfe moderner labordiagnostischer Methoden zuverlässige Prävalenzdaten für *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* und HPV zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde eine bevölkerungsbasierten Studie in der Landgemeinde Pacoti, Bundesstaat Ceará, Nordost-Brasilien, durchgeführt, bei der alle Frauen zwischen 12 und 49 Jahren gynäkologisch und labormedizinisch untersucht wurden. Die Analyse der sozioökonomischen Risikofaktoren für die Präsenz einer oder mehrerer STDs ist Inhalt einer anderen Dissertation.

4.1. Labormethoden

Die Gewinnung der Zervikallavagen zur Durchführung der Untersuchung auf HPV, *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* erfolgte allein durch die Gynäkologin der Studie. Dadurch wurde gewährleistet, dass zufällige Fehler durch verschiedene Entnahme- und Lagerungstechniken minimiert wurden.

Der Vorteil des Untersuchungsmaterials Lavage war, dass alle drei Erreger aus einem Material untersucht werden konnten. Dies verringerte den Untersuchungsaufwand und erhöhte gleichzeitig die Akzeptanz durch die Studienteilnehmerinnen. Die Tests wurden, nach kontrollierter Einarbeitung in die jeweilige Methode durch qualifiziertes Fachpersonal, ebenfalls von nur einer Person (die Autorin dieser Arbeit) ausgeführt. Dies reduzierte ebenfalls mögliche Fehlerquellen. Um die Interassay-Variation möglichst gering zu halten, wurden die Lavagen in möglichst großen Gruppen untersucht.

Die Aussagekraft des Testergebnisses für *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* wurde mittels zweier, im Testkit enthaltener, Positiv- und Negativkontrollen überprüft. Die im Assay ermittelten Probenwerte wurden mit einem Grenzwert in Relation gesetzt, so dass das Ergebnis, wie vom Hersteller vorgegeben, interpretiert werden konnte. Die Berechnungen wurden vom Detektionsgerät automatisch durchgeführt. Waren die im Assay ermittelten Probenwerte der Lavagen im oberen negativen bzw. unteren positiven Normbereich, wurden sie erneut kontrolliert.

Im Rahmen der HPV-Analyse wurde bei der DNS-Extraktion eine Positivkontrolle (HPV18) mitgeführt, die mittels des Digene-Tests bestätigt wurde. Die Aussagekraft der HPV-Testergebnisse im Digene Assays wurde mittels je einer, im Testkit enthaltenen, Positivkontrolle für die low-risk- und die high-risk-Gruppe, sowie einer Negativkontrolle überprüft. Die Ermittlung des Grenzwertes und die Auswertung der Probenwerte erfolgten nach den Kriterien des Herstellers. Zervikallavagen, die ein grenzwertiges Ergebnis erbrachten, wurden durch wiederholte Testung überprüft. Die Aussagekraft der Agarose-Gelelektrophorese wurde durch die Mitführung einer Positivkontrolle gesichert. Die Gültigkeit des INNO-LiPA Tests, zum Nachweis konkreter HPV-Genotypen, wurde mit der vom Hersteller vorgegebenen Konjugatkontrolle überprüft. Die optische Auswertung der Teststreifen erfolgte nach Herstellerangaben.

4.1.1. Nachweis von *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae*

Der labordiagnostische Nachweis einer Infektion mit *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* wurde in der vorliegenden Arbeit auf der Basis der LCR geführt. Dazu wurde ein kommerzielles Verfahren (Abbott LCx[®] *Neisseria gonorrhoeae* Assay / Abbott LCx[®] *Chlamydia trachomatis* Assay) benutzt. Die Nutzung dieser etablierten Methode eignete sich für diese Arbeit, weil es sich um eine vielfach evaluierte Methode mit hoher Sensitivität und Spezifität handelt.

Die Sensitivität des Abbott LCx[®] *Chlamydia trachomatis* Assay bei der Untersuchung von Zervikalabstrichen wird zwischen 83,3% und 87,9% angegeben, die Spezifität mit über 99% [Buimer et al.1996, Sary et al.1997, Schacher et al.2003, Shafer et al.2003]. Die Sensitivität des Abbott LCx[®] *Neisseria gonorrhoeae* Assay bei der Untersuchung von Zervikalabstrichen lag bei verschiedene Untersuchungen zwischen 91,7% und 95,4%, die Spezifität bei über 99% [Buimer et al.1996, Kehl et al.1998, Carroll et

al.1998, Shafer et al.2003]. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Werte auch für Lavagen gelten.

4.1.2. HPV Nachweis

Zum Nachweis einer HPV-Infektion wurden zwei verschiedene Methoden genutzt. Zunächst wurde der Nachweis einer HPV-Infektion mittels eines kommerziellen Tests (Digene[®] SHARP Signal[™]-System / HCII) auf PCR-Basis durchgeführt.

Frühere Untersuchungen dieses Verfahrens zeigten eine Sensitivität zwischen 88% und 100% und eine Spezifität zwischen 80% und 94% und belegen seine hohe Zuverlässigkeit [Lytwyn et al.2000, Schiffman et al.2000, Solomon et al.2001, Guyot et al.2003].

Zum Nachweis bestimmter HPV Genotypen wurde ein weiterer kommerzieller Test (INNO-LiPA HPV Genotyping[®]) verwendet. Dieser Test, der in systematischen Untersuchungen eine hundertprozentige Sensitivität und eine Spezifität von 97,8% zeigte, ist als sehr sensitive und spezifische Methode anerkannt [Kleter et al.1999, Melchers et al.1999, Perrons et al.2005].

Auf Grund der hohen Sensitivität und Spezifität beider Testverfahren war es unerwartet, dass sich bei nur etwas mehr als der Hälfte (57,1%) der ursprünglich mittels HCII positiv auf eine HPV Infektion getesteten Frauen ein positives Ergebnis im INNO-LiPA Test zeigte (Abbildung 6). Da der INNO-LiPA Test bei HPV-Infektionen, neben anderen Genotypen, dieselben HPV-Typen nachweist wie der HCII-Test, war davon auszugehen, dass bei einem positiven HCII-Ergebnis ein konkreter HPV-Typ mittels INNO-LiPA nachzuweisen ist. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Ursache für die Diskrepanz ist unklar. Es scheint, als wäre die Reproduzierbarkeit des HCII-Testes relativ gering. Von den in der Studie untersuchten Proben waren nur 25 von 70 (35,7%) wiederholt getesteten Proben erneut positiv. Hierzu haben Untersuchungen gezeigt, dass die Ergebnisse einer wiederholten HCII-Testung durch die Dauer der Probenlagerung beeinflusst werden [Negri et al.2004, Castel et al.2002]. In einer Studie, die Zervikalabstriche untersuchte, wurden die Proben nach einer Lagerungszeit zwischen einem und 40 Monaten erneut mittels HCII untersucht. Bei bis zu 32% der erneut positiv getesteten Proben kam es zu einer Abnahme der Absorption. Bei bis zu 13% der Proben war nach Testwiederholung keine HPV-DNS mehr nachweisbar [Negri et al.2004]. In einer anderen Untersuchung, die, wie in der vorliegenden Arbeit, Zervikalavagen verwendete, wurde zwar die gute Reproduzierbarkeit des HCII-Tests belegt,

gleichzeitig zeigte sich aber bei der Wiederholung des Tests nach vier Jahren ebenfalls eine Abnahme der Absorption bei positiven Resultaten [Castel et al.2002]. Zusätzlich schwankte bei der Wiederholung nach vier Jahren bei 124 von 142 Proben das Testergebnis zwischen einem negativen und einem schwach positiven Ergebnis [Castel et al.2002]. Zur Überprüfung der HCII-Ergebnisse wurde in der zitierten Arbeit bei 92 der 124 Proben eine PCR mit den Primern MY09/11 durchgeführt. In 68% der Fälle war mittels PCR keine DNS der HPV-Typen nachweisbar, auf die auch mit HCII getestet wurde. Die PCR bestätigte, dass bei einem Großteil der fraglichen HCII-Ergebnisse keine DNS vorhanden bzw. die virale Last zu gering zum Nachweis war [Castel et al.2002]. Daraus lässt sich ableiten, dass sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Lavagen im Verlauf möglicherweise die virale Last bzw. der DNS-Gehalt so verringert hat, dass das ursprüngliche HCII-Ergebnis nicht reproduziert werden konnte.

Da die Sensitivität des INNO-LiPA Tests höher eingeschätzt wird als die des HCII-Tests [Perrones et al.2005], ist es möglich, dass die in der HCII-Wiederholung negativ getesteten Proben im INNO-LiPA Test ein positives Ergebnis erbracht hätten. Aus Kostengründen konnten diese Proben jedoch nicht mit dem INNO-LiPA Test untersucht werden.

Vor diesem Hintergrund ist die Prävalenz von HPV in der Studienpopulation möglicherweise etwas höher als es die vorliegenden Ergebnisse zeigen.

4.2. Demographische und Sozioökonomische Charakteristika

Der Anteil der Studienteilnehmerinnen über 20 Jahren (84,8%) war deutlich höher als jener der jugendlichen Teilnehmerinnen bis 20 Jahre (15,2%). Der Anteil der 12 bis 15 jährigen Mädchen war in der Gruppe der Studienteilnehmerinnen bis 20 Jahre mit nur 2,4% sehr gering. Der größere Anteil entsprach den 16–20 jährigen Frauen (12,8%). Die letzten gesicherten Daten des Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística von 2000 [www.ibge.gov.br] zeigen, dass im Bundesstaat Ceará die weiblichen Altersgruppen wie folgt verteilt sind: Mädchen 12-15 Jahre = 15,7%, Frauen 16-19 Jahre = 14,7%, Frauen 20-49 Jahre = 69,9%. Daraus ergibt sich, dass in der Studienpopulation der Anteil der Mädchen zwischen 12 und 15 Jahren nur etwa 1/6 der in Ceará lebenden Mädchen entsprach, dass aber nahezu alle jungen Frauen zwischen 16 und 20 Jahren an der Studie teilgenommen haben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ein erheblicher Teil der weiblichen Bevölkerung zwischen 12 und 15 Jahren noch

nicht sexuell aktiv war und deshalb definitionsgemäß von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen wurde.

Der Anteil der jugendlichen Studienteilnehmerinnen (bis 20 Jahre) in den Weilern war signifikant höher als der in der Stadt (19,3% versus 12,3%; $p = 0,02$). Nach den Daten des Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística von 2000 leben im Bundesstaat Ceará etwa $\frac{3}{4}$ der Frauen (71,6%) zwischen 10 und 19 Jahren in den Städten und nur $\frac{1}{4}$ der Frauen (28,4%) auf dem Land, so dass man die Mehrzahl der Studienteilnehmerinnen aus der Stadt erwartet hätte. Die überproportionale Teilnahme von auf dem Land lebenden jungen Frauen an der Studie könnte dadurch bedingt sein, dass diese signifikant früher sexuell aktiv waren als die in der Stadt Pacoti lebenden jungen Frauen [unveröffentlichte Daten F. Oliveira 2004].

Im Durchschnitt hatten 45,4% der Studienteilnehmerinnen mehr als sieben Schuljahre absolviert. Verglichen mit den Daten des Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística von 2000 nach denen in Ceará im Durchschnitt nur 31,7% der Frauen mehr als sieben Jahre Schulausbildung und die Mehrzahl der Frauen (68,3%) eine deutlich kürzere Schulausbildung erhielten war der Anteil der Frauen mit höherem Bildungsstand, gemessen an der Anzahl der Schuljahre, in der Studie groß. Im Vergleich der Frauen aus der Stadt und vom Land hatten die auf dem Land lebenden Frauen einen niedrigeren Bildungsstand, gemessen an der Anzahl der Schuljahre, als Frauen im Lebensraum Stadt (79% zu 37%). Vermutlich bedingen unter anderem zwei Faktoren die geringere Schulbildung der Frauen aus den Weilern. Zum einen befindet sich der Hauptteil der weiterführenden Schulen im Stadtgebiet, zum anderen gibt es von den Weilern keine öffentlichen Transportmittel in die Stadt. Womöglich müssen die auf dem Land lebenden Frauen auch ihre Familien bei der Farmarbeit unterstützen und haben somit eine geringere Chance zum Schulbesuch.

Verglichen mit den Frauen aus dem städtischen Bereich verfügte nur die Hälfte der Frauen aus dem ländlichen Gebiet über ein monatliches Haushaltseinkommen von wenigstens 160 US Dollar (14% zu 30%). Allerdings zeichnete sich die gesamte Studienpopulation durch einen hohen Anteil (77%) an extrem armen Haushalten (weniger als 160 US Dollar pro Monat) aus.

Sowohl in der Stadt als auch auf dem Land waren drei von vier Frauen verheiratet bzw. lebten in einer festen Beziehung.

Unter Berücksichtigung der dargelegten Abweichung kann man davon ausgehen, dass die Studienpopulation in demographischer und sozioökonomischer Hinsicht repräsentativ für die im Hinterland lebende, weibliche Bevölkerung von Ceará ist.

4.3. Prävalenz von STDs

Bei 16% der Frauen bestand eine Infektion mit mindestens einer STD. Die Prävalenz zwischen Stadt und Land war ähnlich (16,5% zu 15,4%).

Damit ist die Prävalenz für das Vorliegen von mindestens einer STD niedriger als in anderen Entwicklungsländern wie Madagaskar (39%), Papua-Neuguinea (59%) oder Peru (71%) [Behets et al.2001, Passey et al.1998, García et al.2004]. Eine Studie im brasilianischen Bundesstaat Alagoas [Soares et al.2003] ergab mit 51% ebenfalls eine deutlich höhere Prävalenz für eine Infektion mit mindestens einer STD im Vergleich zu Ceará. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit labormedizinisch nur auf *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* und HPV untersucht, wohingegen in den anderen Studien auch auf *Gardnerella vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* und andere virale Infektionen wie Herpes simplex- und Hepatitis B-Infektionen untersucht wurde. Dies könnte eine Erklärung für die verhältnismäßig geringe Prävalenz in der Population sein. Reduziert man beispielsweise die Daten der Studie aus dem brasilianischen Alagoas auf *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* und HPV so verringert sich die Anzahl der positiv auf eine STD getesteten Proben auf 39%. Allerdings lassen sich mit den vorliegenden Studiendaten keine Mehrfachinfektionen berücksichtigen, so dass die Prävalenz für mindestens eine STD vermutlich noch geringer ist.

Es zeigte sich eine klare Abhängigkeit der Häufigkeit von STDs vom Lebensalter. Das Lebensalter korrelierte invers mit der Prävalenz wenigstens einer STD ($p = < 0,001$). Dabei sank die Prävalenz vor allem zwischen der Altersgruppe der 13-30 jährigen und der 31-50 jährigen Frauen. Diese Beobachtung deckt sich mit denen anderer Untersuchungen [Silveira et al.2002, Boyer et al.2006]. Eine mögliche Ursache für die höhere STD-Prävalenz bei jüngeren Frauen wäre ein risikoreicheres Sexualverhalten. Es zeigte sich, dass nur etwa $\frac{1}{3}$ der Studienteilnehmerinnen bis 20 Jahren (35,6%) in einer festen Beziehung lebten, währenddessen dies mehr als $\frac{3}{4}$ der Frauen über 20 Jahren (81,5%) taten. Dementsprechend ist anzunehmen, dass jüngere Frauen häufiger wechselnde Sexualpartner haben und so einem größeren Infektionsrisiko ausgesetzt sind.

4.3.1. HPV

Die häufigste Infektion innerhalb der Studienpopulation war HPV mit 11,7%. Daten anderer bevölkerungsbasierten Studien aus Südamerika ergaben ähnliche Prävalenzahlen (11% bis 16%) [Matos et al.2003, Clifford et al.2005]. Im Vergleich zu Europa (1,3 bis 7,8%) ist die Prävalenz in südamerikanischen Populationen deutlich höher [Clifford et al.2005].

Tendenziell hatte die Frauen aus Pacoti Stadt häufiger eine HPV-Infektion als Frauen aus den Weilern (13,6% zu 9%; $p = 0,1$). Eine ähnlich hohe Prävalenz wurde bei Frauen aus einem städtischen Bereich in Argentinien gefunden (16,7%) [Matos et al.2003]. Vergleichbare Studien an Frauen aus ländlichen Gebieten Brasiliens ergaben mit 14,3% in Amazonia und 26% in Alagoas eine größere Infektionshäufigkeit [Brito et al.2002, Soares et al.2003]. Es ist fraglich, ob diese Unterschiede auf den Anteil junger Frauen in den Studien zurückzuführen sind. Bei der Studie aus Amazonia könnte der, im Vergleich zur Studienpopulation, doppelt so hohe Anteil junger Frauen bis 19 Jahren (30,4% versus 15,2%) die höhere HPV-Prävalenz (9% zu 14,3%) erklären. Dagegen hat das Lebensalter bei der Studie aus Alagoas scheinbar keinen Einfluss auf die HPV-Prävalenz, da der Anteil der 16 bis 20 jährigen Frauen gleich dem in der vorliegenden Studie ist (12,4% zu 12,8%).

Als signifikanter Risikofaktor für die Präsenz einer HPV-Infektion zeigte sich das Lebensalter. Frauen bis 20 Jahre hatten ein dreifach höheres Infektionsrisiko als solche über 20 Jahren. Ähnlich wie in anderen Untersuchungen sank die HPV Prävalenz mit zunehmendem Lebensalter [Burk et al.1996, Krüger Kjaer et al.1997, Matos et al.2002, Soares et al.2003]. Die höhere Prävalenz im jungen Lebensalter lässt sich möglicherweise mit einer erhöhten HPV-Exposition durch häufiger wechselnde Geschlechtspartner, bei gleichzeitig nicht ausgebildeter Immunantwort erklären. Auch der Gebrauch oraler Kontrazeptiva erhöht vermutlich das Infektionsrisiko für HPV [Krüger Kjaer et al.1997, Koutsky 1997]. Es zeigte sich innerhalb der Studienpopulation, dass 55% der Frauen zwischen 12 und 29 Jahren orale Kontrazeptiva gebrauchten, dies aber nur auf 20% der 30 bis 49 jährigen Frauen zutraf [unveröffentlichte Daten F. Oliveira 2004].

Alleinstehende Frauen hatten ein 1,5-fach höheres HPV-Infektionsrisiko als Frauen, die in einer Partnerschaft lebten. Es ist zu vermuten, dass Alleinstehende Frauen häufiger den Sexualpartner wechseln als liierte Frauen und so ein höheres Infektionsrisiko

haben. Generell erhöht Promiskuität das Risiko für sexuell übertragbare Erkrankungen im allgemeinen und HPV im besonderen [Krüger Kjaer et al.1997, Koutsky 1997, Matos et al.2003].

Insgesamt zeigten 65% der Frauen (7,6% der Studienpopulation) eine Infektion mit nur einem HPV-Typ, während 35% (4,1% der Studienpopulation) mit bis zu vier HPV-Typen infiziert waren. Der Median betrug 1,5 HPV-Typen pro infizierter Frau. Eine Untersuchung HIV-infizierter Frauen aus São Paulo, Brasilien ergab ein nahezu spiegelverkehrtes Bild. Dort überwog mit 79% die Anzahl der mehrfachinfizierten Frauen. Nur 21% der Frauen hatte eine Einfachinfektion. Der Median betrug 3,1 HPV-Typen pro infizierter Frau [Levi et al.2002]. Da das Lebensalter der Teilnehmerinnen in beiden Untersuchungen ähnlich war (Median: 31Jahre zu 32,1 Jahren) und zur Diagnostik die gleiche Methode verwandt wurde, sind diese Variablen vermutlich nicht die Ursache für die unterschiedliche Prävalenz. Denkbar wäre, dass die unterschiedliche Immunkompetenz der Frauen zur Folge hatte, dass bei den Frauen in Pacoti die Einfachinfektion und bei den HIV-infizierten Frauen die Mehrfachinfektionen überwogen. Es scheint, als würde ein defektes Immunsystem eine HPV-Persistenz begünstigen und in der Folge zur Akkumulation mehrerer HPV-Typen führen [Brown et al.1999].

Verglichen mit anderen Daten aus Südamerika (Einfachinfektionen: 8-10,4%; Mehrfachinfektionen: 3-6,5%) war das Vorkommen von Einfach- und Mehrfachinfektionen in Pacoti ähnlich; im Vergleich zu Europa größer [Einfachinfektionen: 1-6,9%, Mehrfachinfektionen: 0,4-1,9%) [Sanjose et al.2003, Matos et al.2003, Clifford et al.2005].

Es scheint also bei HPV-Infektionen nicht nur Unterschiede zwischen den Frauen aus verschiedenen Ländern, sondern auch innerhalb eines Landes zu geben. Denkbar ist, dass ein frühes Eintreten in die Sexualität und das Fehlen einer protektiven Immunität zu einer Akkumulation mehrere HPV-Typen führt. Auch genetische Unterschiede in der Wirtsabwehr (HLA-Polymorphismen) führen vermutlich zu einer unterschiedlichen Empfänglichkeit für HPV-Infektionen [Araujo Souza et al.2003]. Auch die eingesetzten labordiagnostischen Nachweismethoden mit unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität könnten differierende Prävalenzdaten innerhalb eines Landes erklären.

In Pacoti waren von den HPV-infizierten Frauen 72% mit high-risk HPV-Typen infiziert und nur 13% mit low risk-Typen, bei 15% waren Mischinfektionen (low- und high- risk Typen) nachweisbar. Von den high-risk-Typen waren HPV16 und 31 (je n=10; 14,7%)

am häufigsten vertreten, gefolgt von HPV51 und 52 (je n=8; 11,8%), HPV18 und 58 (je n=7; 10,3%). Bei den low-risk-Typen war HPV74 (n=10; 14,7%) am häufigsten vertreten gefolgt von HPV 6 (n=9; 13,2%).

Eine Untersuchung von Frauen eines Mutter-Kind-Gesundheitsprogramms in São Paulo, Brasilien ergab eine ähnliche Verteilungshäufigkeit von low- und high-risk HPV-Typen wie in Pacoti. HPV16 (21,3%) war der am häufigsten vertretene high-risk Typ. Es folgten HPV51 (10,5%), HPV58 (8,2%), HPV31 (7,5%) und HPV18 (6,9%). Bei den low-risk Typen waren am häufigsten HPV 6 und 11 mit 18,1% vertreten [Rousseau et al.2003].

Ein völlig anderes Muster zeigte sich dagegen in der Population HIV-infizierter Frauen aus São Paulo. Nur 21% der Frauen waren ausschließlich mit high-risk HPV infiziert, die Häufigkeit der low-risk HPV-Infektionen war ähnlich (14%), die Anzahl der "Mischinfektionen" war mit 64% allerdings deutlich höher als bei den Frauen aus Pacoti. Die Verteilung der HPV-Typen unterschied sich ebenfalls. In der high-risk-Gruppe war HPV51 (32%) der häufigste Typ, gefolgt von HPV18 (24%) und HPV16 (23%). In der low-risk-Gruppe war, wie in der zuvor diskutierten Studie, HPV 6 (39%) der häufigste Typ, gefolgt von HPV11 (26%). Interessanterweise war HPV6 insgesamt der am häufigsten vertretene Genotyp [Levi et al.2002]. Diese Daten zeigen, dass es in einem Land einen erheblichen Unterschied in der Häufigkeit und der Art von HPV-Genotypen bei Frauen gibt. Die Ursachen dafür sind unbekannt. Die Tatsache an sich hat gleichwohl große Bedeutung für die Planung von Präventionsmaßnahmen beispielsweise durch Vakzinierung.

Untersuchungen an sexuell aktiven Frauen aus Nigeria, Asien, Südamerika und Europa (n=15613) über die Verteilung verschiedener HPV-Typen zeigten, dass sowohl bei Einfach- als auch Mehrfachinfektionen high-risk HPV16 (19,7%) der am häufigsten vorkommende HPV-Typ war, gefolgt von low-risk HPV42 (9,4%),den high-risk-Typen HPV58 (7,6%), HPV31 (7,5%), HPV18 (7,2%),HPV56 (7,1%) und low-risk HPV81 (6,2%). Die low-risk-Typen HPV 6 und HPV11 waren beide zu je 1,4% vertreten.

Die häufigsten Infektionen mit high-risk-Typen in Südamerika waren HPV16 (15%) und HPV58 (7%). In Europa fand man häufigsten HPV16 (21%) gefolgt von HPV31 (9%). Sowohl in Südamerika als auch in Europa waren nur 5% der Frauen mit HPV18 infiziert [Clifford et al.2005]. Es zeigte sich eine ähnlich hohe Prävalenz für HPV16 und 58 in der hier untersuchten Studienpopulation im Vergleich zu anderen südamerikanischen

Ländern. Dies ist ein Indikator für die große Bedeutung dieser beiden high-risk HPV-Typen. Im Vergleich waren Infektionen mit HPV18 innerhalb der beobachteten Studienpopulation etwa doppelt so häufig (10,3%). Die Ursache dafür ist unklar.

Die häufigsten HPV-Infektionen mit low-risk-Typen sowohl in Südamerika als auch in Europa waren HPV42 und HPV81. In beiden Ländern war die Prävalenz für HPV42 (5%) identisch; HPV81 trat mit 4% in Südamerika doppelt so häufig auf wie in Europa [Clifford et al.2005]. In Pacoti wurde keine HPV42 Infektion nachgewiesen werden, der Nachweis von HPV81 war mit der gewählten Nachweismethode nicht möglich. Vergleichsdaten aus Südamerika oder Brasilien zu den in der Studienpopulation am häufigsten vertretenen low-risk-Typen HPV74 und HPV 6 waren nicht verfügbar. Untersuchungen an Frauen aus Nigeria, Asien, Südamerika und Europa (n=15613) zeigten dagegen eine allgemein geringe Prävalenz für HPV 6 von 1,4% [Clifford et al.2005]. Gemessen daran war die Prävalenz von HPV 6 mit 13,2% etwa neunmal so hoch. Die Ursache für die vergleichsweise untypische Verteilung von HPV low-risk-Typen innerhalb der brasilianischen Studienpopulation ist unklar.

Eine Infektionsprävention für die in Pacoti häufig vorkommenden Typen HPV16, HPV18 und HPV 6 wäre mittels des im Juni 2006 in den USA zugelassenen quadrivalenten HPV-Impfstoffes Gardasil® möglich [Villa et al.2005, Stanley 2006, Merck & CO 2006]. Dies ist in sofern relevant, da HPV 16 und 18 in der vorliegenden Studie und höchstwahrscheinlich auch weltweit, die am weitesten verbreiteten high-risk HPV-Typen sind und gleichzeitig in etwa 70% aller Zervixkarzinome nachweisbar sind [Clifford et al.2005, Steinbrook 2006]. Auch die Prävention einer HPV 6-Infektion wäre für die Frauen in Pacoti sinnvoll, da dieser neben HPV11 in etwa 90% aller Genitalwarzen nachweisbar ist [Steinbrook 2006]. Genitalwarzen gelten als HPV bedingte Läsion mit geringem Entartungspotential, zweifellos führen sie aber zu einer erhöhten Proliferationsrate des Epithels und bergen damit ein Karzinomrisiko. Für eine HPV-Prävention mittels Vakzinierung spricht außerdem, dass sich die Empfänglichkeit für eine HIV-Infektion beim Vorliegen einer unbehandelten STD um bis zu Faktor 10 erhöht [WHO 2004], so dass die Vakzinierung nicht nur im Rahmen der Krebsvorsorge, sondern auch im Rahmen der allgemeinen HIV-Prävention eine wichtige Rolle spielen würde.

4.3.2. Chlamydia trachomatis

Der häufigste bakterielle Infektionserreger innerhalb der Studienpopulation war *C. trachomatis* mit 4,5%. Frauen auf dem Land waren signifikant häufiger infiziert als Frauen in der Stadt (7,3% zu 2,6%).

Studien an Frauen, die STD-Kliniken in Manaus-AM und Goiânia-Goiás, Brasilien konsultierten, ergaben mit 21% bzw. 20% eine deutlich höhere Prävalenz [Santos et al.2003, Araújo et al.2006]. Studien aus ländlichen Gebieten in Brasilien und Peru zeigten allerdings eine ähnliche Häufigkeit wie die vorliegende Studie (6,4% bzw. 6,8%) [Soares et al.2003, García et al.2004], so dass man davon ausgehen kann, dass die hier gefundenen Prävalenzen für die durchschnittliche, weibliche Bevölkerung auf dem Lande gelten.

Die Infektionshäufigkeit war für in den Weilern lebende Frauen in etwa dreimal so hoch wie für Frauen im Zentrum von Pacoti. Dies widerspricht der allgemeinen Annahme, dass das Risiko für STDs im allgemeinen und für Chlamydieninfektionen im besonderen in der Stadt höher ist als auf dem Land [WHO 2001].

Die Ursache der höheren Prävalenz von *C. trachomatis* bei auf dem Land lebenden Frauen ist unklar. Denkbar ist, dass der häufig asymptomatische Verlauf der Infektion (ca. 70%) und der schlechtere Zugang zu allgemeiner medizinischer und speziell gynäkologischer Versorgung der Landfrauen häufiger zu unbehandelten, chronisch-persistierenden Infektionen führt. Möglicherweise werden in der Stadt Frauen auch häufiger beim Vorliegen internistischer Erkrankungen antibiotisch behandelt, so dass eine gleichzeitig bestehende, unerkannte Chlamydieninfektion eliminiert wird.

Jüngere Frauen bis 20 Jahre hatten eine deutlich höhere Infektionsrate im Vergleich zu älteren Frauen (OR = 2,75; p = 0,02). Dies bestätigt das derzeitige Paradigma, dass junge Frauen ein erhöhtes Risiko für eine Chlamydieninfektion haben [Norman 2002, Silveira et al.2002, Araújo et al.2006, Boyer et al.2006]. Die Infektionshäufigkeit innerhalb der Studienpopulation sank, wie auch bei anderen STDs, mit zunehmendem Lebensalter (p = 0,01).

4.3.3. Neisseria gonorrhoeae

Eine Gonokokkeninfektion ließ sich bei 1,7% der Frauen nachweisen. Hier war allerdings die Infektionshäufigkeit in der Stadt höher als auf dem Land (2,3% versus 0,9%). Die Häufigkeit einer Gonorrhoe war ähnlich hoch wie in einer populationsbasierten Studie aus einem ländlichen Gebiet in Peru mit 1,2% [Garcia et al.2004], allerdings deutlich niedriger als in einer populationsbasierten Studien an Frauen aus einem ländlichen Gebiet in Alagoas, Brasilien mit 6,4% [Soares et al.2003].

Da die absolute Zahl der infizierten Frauen mit zehn sehr gering war, ließ sich kein klares Risikomuster erkennen. Allerdings schien auch hier, wie bei den anderen Infektionen, das Alter ein Risikofaktor zu sein. Junge Frauen bis 20 Jahre hatten ein 1,5 fach höheres Risiko als Frauen über 20 Jahre (OR = 1,47).

5. Zusammenfassung

Sexuell übertragbare Krankheiten stellen nach wie vor ein erhebliches, gesundheitliches Problem in Entwicklungsländern dar, da Prävalenz und Morbidität hoch sind. Dies hängt sowohl mit dem Risikoverhalten zusammen, als auch mit der Tatsache, dass eine adäquate medizinische Infrastruktur häufig nicht gegeben ist. Insbesondere Frauen auf dem Land haben häufig keinen oder nur begrenzten Zugang zu medizinischer Versorgung. Primär leiden Frauen unter den Komplikationen unerkannter Genitalinfektionen, die zu chronischen Entzündungen der Geschlechtsorgane, Infertilität und Neoplasien führen können. Gleichzeitig können einige dieser unbehandelten Infektionen unter der Geburt auf das Neugeborene übertragen werden. Je nach Land, Bevölkerungsgruppe oder Kulturkreis sind unterschiedliche Erreger von Bedeutung. In Entwicklungsländern sind kostengünstig therapierbare Infektionen mit *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* besonders häufig, ebenso Infektionen mit HPV, gegen dessen weit verbreiteten Typen HPV 6, 11, 16 und 18 seit kurzem ein Impfstoff zur Verfügung steht. Die Datenlage zur Prävalenz der verschiedenen Erreger ist allerdings meist spärlich und so fehlt die Grundlage, auf der Gesundheitsbehörden Kontroll- und Präventionsmaßnahmen planen können.

In diesem Zusammenhang wird die Bedeutung populationsbasierter Studien in Brasilien deutlich, da die meisten der vorliegenden Daten über STDs von selektiven Untersuchungsgruppen wie Prostituierten oder Gefängnisinsassinnen stammen und nicht für die allgemeine weibliche Bevölkerung repräsentativ sind. Vor diesem Hintergrund war das Hauptziel dieser Arbeit, die Häufigkeit von *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* und HPV bei Frauen aus einem ländlichen Gebiet im Nordosten Brasiliens in Abhängigkeit von demographischen, sozio-kulturellen und ökonomischen Variablen zu bestimmen.

Durch den Vergleich demographischer und sozioökonomischer Charakteristika der Studienteilnehmerinnen mit denen von Frauen einer anderen bevölkerungsbasierten Studie aus einem ländlichen Gebiet im Nordosten Brasiliens ist davon auszugehen, dass die Frauen von Pacoti ein repräsentatives Kollektiv für die weibliche Bevölkerung im Hinterland von Ceará darstellen.

Mittels moderner labormedizinischer Methoden, die eine hohe Sensitivität und Spezifität garantieren, wurden Zervikallavagen auf das Vorliegen von Infektionen mit *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* und HPV untersucht. Die zusätzliche HPV-Typisierung ermöglichte die Abschätzung des Risikos maligner Entartungen durch die Präsenz definierter high-risk HPV-Typen.

16% der Frauen in Pacoti waren mit mindestens einem der drei Erreger infiziert. Die häufigste Infektion war HPV mit 11,7%. Eine bakterielle Infektion mit *C. trachomatis* war bei 4,5%, eine Gonokokkeninfektion bei 1,7% der Frauen nachweisbar.

Dabei wurde deutlich, dass die Prävalenz innerhalb der Studienpopulation, sowohl für das Vorliegen einer STD, als auch für HPV- und Chlamydieninfektionen altersabhängig ist; die Infektionshäufigkeit sank signifikant mit zunehmendem Alter. Aufgrund der niedrigen absoluten Zahl von Frauen, die mit *N. gonorrhoeae* infiziert waren, ließ sich hier kein klares Risikomuster erkennen. Das Lebensalter schien allerdings ebenfalls einen Einfluss auf die Prävalenz einer Gonorrhoe zu haben.

Einfach- und Mehrfach-HPV-Infektionen innerhalb der Studienpopulation waren mit 7,6% bzw. 4,1% ähnlich hoch wie in anderen südamerikanischen Ländern, im Vergleich zu Europa aber häufiger. Der größte Anteil der Frauen in Pacoti hatte eine Infektion mit high-risk HPV-Typen (72%). Low-risk- und Mischinfektionen waren nur bei 13% bzw. 14% der Frauen vorhanden. Am häufigsten waren die high-risk-Typen HPV16 und HPV31 vertreten. Bei den low-risk-Typen überwogen Infektionen mit HPV74 und HPV 6. Der Vergleich mit anderen Studien zeigt, dass die Infektionshäufigkeit für *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* und HPV repräsentativ für Frauen aus dem ländlichen Brasiliens zu sein scheint.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung, eines typischen, weiblichen Kollektivs in Nordost Brasilien zeigen, dass die Notwendigkeit für ein Kontroll- und Präventionsprogramm von STDs für diese Region besteht. Außerdem wird die Unumgänglichkeit weiterer populationsbasierter Studien bezüglich der Prävalenz von STDs in anderen Gebieten Brasiliens für die Gestaltung eines landesweiten Kontroll- und Präventionsprogramm deutlich.

6. Literatur

1. Araújo RSC, Guimaraes EMB, Alves MFC et al.: Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in adolescent females and young women in central Brasil. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006; 25: 397-400
2. Araujo PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. Mutation Research 2003; 544:375-383
3. Behets F, Andriamiadana J, Rasamilalao D et al.: Sexually transmitted infections and associated socio-demographic and behavioural factors in women seeking primary care suggest Madagascar's vulnerability to rapid HIV spread. Tropical Medicine and International Health 2001;6 (3):202-211
4. Bonnez W, Reichmann RC.: Papillomavirus. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Hrsg): Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. New York:Churchill Livingstone Inc, 1995:1630-1644
5. Boyer CB, Shafer M-AB, Pollack LM, Canchola J, Moncada J, Schachter J.: Sociodemographic Markers and Behavioral Correlates of Sexually Transmitted Infections in a Nonclinical Sample of Adolescent and Young Adult Women. The Journal of Infectious Diseases 2006;194:307-315
6. Clifford GM, Gallus S, Herrero R et al.: Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal woman in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. Lancet 2005; 366:991-98
7. Bradley JM, Wiley DJ.: Will Widespread Human Papillomavirus Prophylactic Vaccination Change Sexual Practices of Adolescent and Young Adult Women in America? Obstetrics&Gynecology 2006;108(2):420-424
8. Brito EB, Martins SJ, Menezes RC.: Human papillomaviruses in Amerindian women from Brazilian Amazonia. Epidemiol. Infect. 2002; 128, 485-489
9. Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH, Fife KH.: Detection of Multiple Human Papillomavirus Types in Condylomata Acuminata Lesions from Otherwise Healthy and Immunosuppressed Patients. J Clin Microbiol 1999;37(10):3316-3322

10. Buimer M, van Doornum GJJ, Ching S et al.: Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by Ligase Chain Reaction-Based Assays with Clinical Specimens from Various Sites: Implications of Diagnostic Testing and Screening. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2395-2400
11. Burd EM.: Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 2003, 1-17
12. Burk RD, Kelly PFP, Feldman JDRPH et al.: Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection With Age Is Independent of Other Risk Factors. *Sex Trans Dis* 1996;23(4):333-341
13. Bush RM, Everett KDE: Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; 51:203-220
14. Carroll KC, Aldeen WE, Morrison M, Anderson R, Lee D, Mottice S.: Evaluation of the Abbott LCx Ligase Chain Reaction assay for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Urine and Genital Swab Specimens from a Sexually Transmitted Disease Clinic Population. *J Clin Microbiol* 1998; Vol 36 No 6: 1630-1633
15. Castel PE, Lorincz AT, Mielzynska-Lohnas I et al.: Results of Human Papillomavirus DNA Testing with the Hybrid Capture 2 Assay Are Reproducible. *J Clin Microbiol* 2002;40(3):1088-1090
16. Clifford GM, Gallus S, Herrero R et al: Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; 366:991-98
17. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S.: Human papillomavirus types in cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer* 2003; 88:63-73
18. Codes JS, Cohen DA, de Melo NA et al.: Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em ambientes clínicos e não clínicos na Cidade de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad.Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2006; 22(2):325-334
19. Cook RL, May S, Harrison LH et al.: High Prevalence of Sexually Transmitted Diseases in Young Women Seeking HIV Testing in Rio de Janeiro, Brazil. *Sex Transm Dis* 2004;31(1):67-72

20. Davies P, Kornegay J, Iftner T.: Current methods for human papillomavirus testing. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2001; 15(5):677-700
21. Doorn van LJ, Kleter B, Quint WGV.: Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2001; 1(4):394-402
22. Duynhofen YTHP: The epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe. *Microbes and Infection* 1999;1:455-464
23. Ebert A, Leo-Roßberg I, Hopp H.: Spezielle Untersuchungstechniken. In: Ebert AD, Weitzel HK. *Gynäkologischer Untersuchungskurs*. 1th ed. Berlin; New York: de Gruyter, 1998:141-159
24. Garcia PJ, Chavez S, Feringa B et al.: Reproductive tract infections in rural women from the highlands, jungle, and coastal regions of Peru. *Bulletin of the World Health Organization* 2004; 82:483-492
25. Gerbase AC., Rowley JT, Heymann DHL. Berkley SFB, Piot P: Global prevalence and incidence estimates of selectable curable STDs. *Sex Transm Inf* 1998; 74 (Suppl 1): S12-S16
26. Gerbase AC, Rowley JT, Mertens TE: Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* 1998; 351 (Suppl 3): 2-4
27. Gomes JP, Tavira L, Exposto F, Prieto E, Catry MA.: *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections in patients attending STD and family planning clinics in Bissau, Guinea-Bissau. *Acta Tropica* 2001; 80:261-264
28. Guyot A, Karim S, Kyi MS, Fox J.: Evaluation of adjunctive HPV testing by Hybrid Capture II[®] in women with minor cytological abnormalities for the diagnosis of CIN2/3 and cost comparison with colposcopy. *BMC Infectious Diseases* 2003;3:23
29. Handsfield HH, Sparling PF.: *Neisseria gonorrhoeae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (Hrsg): *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Churchill Livingstone Inc, 2004:2514-2529
30. Innogenetics N.V. 2002. www.innogenetics.com
31. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2000. www.ibge.gov.br
32. Jones RB, Batteiger BE.: Introduction to Chlamydial Diseases. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Hrsg): *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. New York:Churchill Livingstone Inc, 1995:1986-1989

33. Jones RB, Batteiger BE.: *Chlamydia trachomatis*. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Hrsg): Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. New York:Churchill Livingstone Inc, 1995:1989-2004
34. Kehl SC, Georgakas K, Swain GR et al.: Evaluation of the Abbott LCx Assay for Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Endocervical Swab Specimens from Females. J Clin Microbiol 1998;36(12): 3549-3551
35. Kleter B, van Dooren L-J, Schrauwen L et al.: Development and Clinical Evaluation of a Highly Sensitive PCR-Reverse Hybridization Line Probe Assay for Detection and Identification of Anogenital Human Papillomavirus. J Clin Microbiol 1999;37(8): 2508-2517
36. Koutsky L: Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection. Am J Med. 1997;102(5A):3-8
37. Koutsky LA, Ault KA, Cosette MW et al.: A Controlled Trial Of A Human Papillomavirus Type 16 Vaccine. N Engl J Med 2002;347(21):1645-1651
38. Krüger Kjaer S, van de Brule AJC, Bock JE et al.: Determinants for Genital Human Papillomavirus (HPV) Infection in 1000 Randomly Chosen Young Danish Women with Normal Pap Smear: Are There Different Risk Profiles for Oncogenic and Nononcogenic HPV Types? Cancer Epidemiology 1997; Vol 6:799-805
39. Levi JE, Fink MCS, Canto CLM et al.: Human Papillomavirus prevalence, viral load and cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. Braz J Infect Dis 2002, Vol.6 No.3
40. Levi JE, Kleter B, Quint WGV et al.: High Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) Infections and High Frequency of Multiple HPV Genotypes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women in Brazil. J Clin Microbiol 2002;40(9):3341-3345
41. Lytwyn A, Sellors JW, Mahony JB et al.: Comparison of human papillomavirus DNA testing and repeat Papanicolaou test in women with low-grade cervical cytologic abnormalities: a randomized trial. CMJA 2000;163(6):701-707
42. Matos E, Loria D, Amestoy GM et al.: Prevalence of Human Papillomavirus Infection Among Women in Concordia, Argentina: A Population-Based Study. Sex Trans Dis 2003;Vol.30,No.8:593-599

43. Melchers WJG, Bakkers JMJE, Wang J et al.: Short Fragment Polymerase Chain Reaction Reverse Hybridization Line Probe Assay to Detect and Genotype a Broad Spectrum of Human Papillomavirus Types. *Clinical Evaluation and Follow –Up. AJP* 1999;155(5):1473-1478
44. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ, USA.: Gardasil® (Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine). June 2006
45. Mgone CS, Lupiwa T, Yeka W.: High Prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* and Multiple Sexually Transmitted Diseases Among Rural Women in the Eastern Highlands Province of Papua New Guinea, Detected by Polymerase Chain Reaction. *Sex Trans Dis* 2002; 29(12):775-779
46. Miranda AE, Vargas PM, St. Louis ME, Viana MC.: Sexually transmitted diseases among female prisoners in Brazil. *Sex Transm Dis* 2000;27(9):491-495
47. Muñoz N, Bosch X, de Sanjosé S et al.: Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003; 348;6:518-527
48. Negri G, Rigo B, Vittadello F, Egarter-Vigl E, Mian C.: Human papillomavirus typing with hybride capture II on archived liquid-based cytologic specimes: is HPV typing always reproducible? *Am J Clin Pathol* 2004; 122(1):90-93
49. Norman J.: Epidemiology of female genitale *Chlamydia trachomatis* infections. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2002; Vol.16, No.6:775-787
50. Paavonen J, Lethinen M: Chlamydial pelvic inflammatory disease. *Human Reproduction Update* 1996; Vol 2, No 6 pp 519-529
51. Passey M, Mgone CS, Lupiwa S et al.: Community based study of sexually transmitted diseases in rural women in the highlands of Papua New Guinea: prevalence and risk factors. *Sex Transm Inf* 1998;74:120-127
52. Perrons C, Jelley R, Kleter B, Quint W, Brink N.: Detection of persistent high risk human papillomavirus infections with hybride capture II and SPF10/LiPA. *Journal of Clinical Virology* 2005;32:278-285
53. Queiroz C, Travassos AG, Studart E et al.: Prevalence of Human Papilloma Virus in HIV-Positiv and HIV-Negativ Patients in the State of Bahia. A Pilot Study. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2004; 8(5):356-362

54. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhaes AV.: Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003, Vol.98 No.2
55. Rousseau M-C, Villa LL, Costa MC, Abrahamowicz M, Rohan TE, Franco E.: Occurrence of Cervical Infection with Multiple Human Papillomavirus Types is Associated with Age and Cytologic Abnormalities. Sex Trans Dis 2003;Vol. 30, No. 7:581-587
56. Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE et al.: Association of *Chlamydia trachomatis* with Persistence of High-Risk Types of Human Papillomavirus in a Cohort of Female Adolescents. Am J Epidemiol 2005;162:668-675
57. Sanjose S, Almirall R, Llovaes B et al.: Cervical Human Papillomavirus Infection in the Female Population in Barcelona, Spain. Sex Trans Dis 2003;Vol.30, No.10:788-793
58. Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S.: Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Woman in Manaus-AM, Brazil, by PCR. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2003; 7(2):91-95
59. Schachter J, McCormack WM, Chernesky M et al.: Vaginal Swabs Are Appropriate Specimens for Diagnosis of Genital Tract Infections with *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 2003;41(8):3784-3789
60. Schiffman M, Herrero RH, Hildesheim A et al.: HPV DNA Testing in Cervical Cancer Screening Results From Women in a High-Risk Province of Costa Rica. JAMA 2000;283(1):87-93
61. Shafer M-A, Moncada J, Boyer CB, Betsinger K, Flinn SD, Schachter J.: Comparing First-Void Urine Specimens, Self-Collected Vaginal Swabs, and Endocervical Specimens To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by a Nucleic Acid Amplification Test. J Clin Microbiol 2003;41(9):4395-4399
62. Silveira MF, Béria JU, Horta BL, Tomasi A, Victora CG.: Factors Associated With Risk Behaviors for Sexually Transmitted Diseases/AIDS Among Urban Brazilian Women. Sex Trans Dis 2002;Vol.29, No.9:536-541
63. Smith JS, Bosetti C, Munoz N et al.: *Chlamydia Trachomatis* And Invasive Cervical Cancer: A Pooled Analysis Of The IARC Multicentric Case-Control Study. Int J Cancer 2004: 111, 431-439

64. Soares VL, de Mesquita AMTS, Cavalcante FGT et al.: Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Tropical Medicine and International Health* 2003; Vol8 No7: 595-603
65. Solomon D, Schiffman M, Tarone R.: Comparison of Three Management Strategies for Patients With Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: Baseline Results From a Randomized Trial. *Journal of National Cancer Institute* 2001;93(4):293-299
66. Sparling PF, Handsfield HH.: *Neisseria gonorrhoeae*. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Hrsg): *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. New York:Churchill Livingstone Inc, 1995:2242-2258
67. Stamm WE, Jones RB, Batteiger BE.: *Chlamydia trachomatis*. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (Hrsg): *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Churchill Livingstone Inc, 2004:2239-2251
68. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Rev.Med.Virol.* 2006;16:139-149
69. Stary A, Najim B, Lee HH.: Vulval Swabs an Alternative Specimes for Ligase Chain Reaction Detection of Genital Chlamydial Infection in Women. *J Clin Microbiol* 1997;35(4):836-838
70. Steinbrook R.: The Potential of Human Papillomavirus Vaccines. *N Engl J Med* 2006;354(11):1109-1112
71. Thomas JO, Herrero R, Omigbodum AA et al.: Prevalence of papillomavirus infection in women in Ibadan, Nigeria: a population-based study. *British Journal of Cancer* 2004;90:638-645
72. Trofatter KF.: Diagnosis of Human Papillomavirus Genital Tract Infection. *Am J Med.* 1997; 102(5A):21-27
73. Villa LL, Costa RLR, Petta CA et al.: Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005;6:271-278
74. Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H.: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27
75. Vogel F, Hofheim, Scholz H et al.: Rationaler Einsatz oraler Antibiotika bei Erwachsenen. *Chemother J* 2002; 11: 47-58

76. Weissenbacher ER, Schneider A, Gissmann L et al.: Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion des weiblichen Genitale. ESIDIGO Journal Vol. 4+5 2001:3-12
77. World Health Organisation: Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections - Overview and Estimates. Geneva 2001
78. World Health Organisation: Sexually Transmitted Infections (STIs) as a Public Health Issue. Fact Sheet 2004

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	- Abbildung
BCIP	- Bromochloroindolylphosphat
bp	- Basenpaare
CO	- Grenzwert
DNS	- Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	- Desoxyribonucleotid-Trisphosphat
DS	- Denaturierungsreagenz
EB	- Elementarkörperchen
EQV	- Grauzone
HCII	- Digene Sharp Signal [®] System
HIV	- Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	- Humanes Leukozytenantigen
HPV	- Humanes Papillomavirus
HRT	- high-risk Typ
KI	- Konfidenzintervall
KR	- Kontrollregion
LCR	- Ligaseskettenreaktion
LRT	- low-risk Typ
MEIA	- Mikropartikel-Enzymimmunoassay
MgCl ₂	- Magnesiumchlorid
MKS	- Molekulargewichtsstandard
NBT	- Nitroblue Tetrazolium
OR	- Odds Ratio
Pap	- Papaniculau
PCR	- Polymerasekettenreaktion
PID	- pelvic inflammatory disease
PSF	- Programa de Saúde da Família
RB	- Retikularkörperchen
S	- Probenwert
STD	- sexually transmitted disease
Tab.	- Tabelle
WHO	- World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	
Lebenszyklus von <i>C. trachomatis</i> in der Zellkultur [nach Jones et al.1995].....	7
Abbildung 2:	
Infektionszyklus von <i>N. gonorrhoeae</i> [nach Sparling et al.1995]	10
Abbildung 3:	
Schematische Darstellung des HPV-Genoms und die Position zweier Primersets [nach van Doorn et al.2001]	13
Abbildung 4:	
Replikationszyklus von HPV in der Haut [nach Bonnez et. al.1995].....	14
Abbildung 5:	
Auswertung des INNO-LiPA HPV Genotyping® Tests [nach Innogenetics 2002]	31
Abbildung 6:	
Ablaufdiagramm der HPV-Analyse	45
Abbildung 7:	
Prävalenz der STD, aufgeteilt nach dem Lebensraum	47
Abbildung 8:	
Darstellung der Prävalenz in Abhängigkeit vom Alter	48
Abbildung 9:	
Vorkommen von HPV-Genotypen bei den Frauen der Studienpopulation.....	49
Abbildung 10:	
Matrix des kombinierten Auftretens von HPV-Genotypen in der Studienpopulation	50
Abbildung 11:	
Verteilung der HPV-Genotypen in der Gruppe HPV-infizierter Frauen (n=68).....	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	
Chlamydien / Chlamydophila - Spezies, Übertragungswege und Krankheiten [nach Jones et al.1995, Bush et al.2001].....	5
Tabelle 2:	
Charakteristika konventioneller Nachweismethoden für <i>C. trachomatis</i> [nach Buimer et al.1996].....	9
Tabelle 3:	
Charakteristika konventioneller Nachweismethoden für <i>N. gonorrhoeae</i> [nach Buimer et al. 1996, Handsfield 2004]	12
Tabelle 4:	
Beispiele HPV bedingter Krankheitsbilder [nach de Villiers et al.2004]	14
Tabelle 5:	
Charakteristika konventioneller HPV Screeningmethoden [nach Trofatter 1997]	17
Tabelle 6:	
Befunde der erweiterten Kolposkopie [nach Ebert et al.1998].....	17
Tabelle 7:	
Charakteristika von DNS-Tests zum HPV-Nachweis [nach Trofatter 1997, Schiffmann et al.2000, Kletter et al.1999].....	18
Tabelle 8:	
Durchführung des Abbott LCx [®] <i>Chlamydia trachomatis</i> -Assay und <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -Assay (nach Herstellerangaben)	23
Tabelle 9:	
DNS-Extraktion mit QIAamp [®] DNS Minikit (nach Herstellerangaben)	26
Tabelle 10:	
Digene SHARP Signal System [®] - Amplifikation (nach Herstellerangaben)	27
Tabelle 11:	
Digene SHARP Signal System [®] - Detektion (nach Herstellerangaben).....	28
Tabelle 12:	
Innogenetics INNO-LiPA HPV Genotyping [®] – Amplifikation (nach Herstellerangaben).32	
Tabelle 13:	
Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese	32

Tabelle 14:	
Innogenetics INNO-LiPA HPV Genotyping® – Detektion (nach Herstellerangaben).....	34
Tabelle 15:	
Demographische und sozioökonomische Charakteristika der Studienteilnehmerinnen unterteilt nach Lebensraum	42
Tabelle 16:	
Prävalenz der STD bei den Frauen der Studienpopulation (n=580)	46
Tabelle 17:	
Zusammenhang von Prävalenz und Lebensalter (Chi-Quadrat Test).....	48
Tabelle 18:	
HPV-Infektionen unterteilt nach Genotypen.....	49
Tabelle 19:	
Demographische und sozioökonomische Risikofaktoren für die Präsenz mindestens einer STD (univariate Analyse)	52
Tabelle 20:	
Demographische und sozioökonomische Risikofaktoren für die Präsenz von HPV (univariate Analyse)	53
Tabelle 21:	
Demographische und sozioökonomische Risikofaktoren für die Präsenz von <i>C. trachomatis</i> (univariate Analyse)	54
Tabelle 22:	
Demographische und sozioökonomische Risikofaktoren für die Präsenz von <i>N. gonorrhoeae</i> (univariate Analyse)	55

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Hermann Feldmeier, danke ich für die Überlassung des Themas, die Ermutigung zum wissenschaftlichen Arbeiten, sowie die immer freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit über die ganze Zeitspanne hinweg.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ignatius, Frau Prof. Dr. med. Marina Stöffler-Meilicke und Frau Dr. med. Elisabeth Engelmann, für die immer hilfreiche und fruchtbare Anleitung zum praktischen Arbeiten, sowie zur Organisation der Laborarbeit bedanken.

Bei Frau Fabiolá Araújo Sales de Oliveira bedanke ich mich für die Gewinnung und Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.

Dem Team der medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilung für Virologie und Mikrobiologie der Charité – Universitätsmedizin, Campus Benjamin – Franklin danke ich besonders für die hilfreiche und kompetente Einarbeitung in die verschiedenen labormedizinischen Methoden und die jederzeit bereitwillige und freundliche Hilfestellung.

Meinen Eltern gilt mein aufrichtiger Dank, denn nur mit ihrer uneingeschränkten Unterstützung habe ich mein Studium und diese Arbeit abschließen können.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Torsten Ehrig. Vielen lieben Dank für die ständige Ermutigung, das Verständnis und die viele Geduld, die diese Arbeit möglich machte.

Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

Erklärung

„Ich, [Viola Ehrig], erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Häufigkeit von humanem Papillomavirus-, *Neisseria gonorrhoeae*- und *Chlamydia trachomatis*-Infektionen bei Frauen im ländlichen Nordost-Brasilien“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift