

Aus der Klinik für Gynäkologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Explorative Evaluation zweier innovativer hrHPV-E7-Nachweissysteme zur  
Erfassung zervikaler Dysplasien in Arztsamples und Selfsamples**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sébastien Liung-Kin Ng Kuet Leong

aus Kassel

Datum der Promotion: 23.06.2019

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Zusammenfassung.....	VII
Abstract .....	VIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Humane Papillomviren .....	1
1.1.1 Die Molekularbiologie von HPV .....	1
1.1.2 Der Krankheitswert von HPV-Infektionen.....	3
1.2 Das Zervixkarzinom .....	5
1.2.1 Die Epidemiologie des Zervixkarzinoms.....	5
1.2.2 Die histopathologische Einteilung des Zervixkarzinoms.....	6
1.2.3 Der Krankheitsverlauf .....	6
1.3 Die Erfassung einer zervikalen Dysplasie .....	7
1.3.1 Die Zytopathologie, die Kolposkopie und die Histopathologie.....	7
1.3.2 Der hrHPV-DNA-Nachweis.....	8
1.3.3 hrHPV-E7-Onkoprotein als diagnostischer Ansatz, PIPAVIR und Selsamples.....	8
1.4 Fragestellung.....	9
2 Methoden und Materialien .....	10
2.1 Studiendesign und Patientinnenrekrutierung.....	10
2.1.1 Ablauf – Hochrisikokohorte.....	10
2.1.2 Ablauf – Screeningkohorte.....	11
2.2 Entnahme einer zervikovaginalen Probe .....	12
2.2.1 Die Probenentnahme durch einen Gynäkologen (Arztsample).....	12
2.2.2 Selfsampling per Lavage (Delphi® Screener) .....	12
2.2.3 Selfsampling per Bürste (Evalyn® Brush).....	13
2.3 Testungen.....	13
2.3.1 Der Biosynex® Rapid Strip E7 Test .....	13
2.3.2 Der Mikrogen® recomWell ELISA E7 Test.....	15
2.3.3 GP5+/6+-PCR und Genotypisierung mittels Luminex-Technologie .....	16
2.4 Auswertung.....	16
2.4.1 Vereinheitlichung von Zytologie, Kolposkopie und Histopathologie mittels ASSIST-Coding .....	16
2.4.2 ASSIST-Severity-Index (ASSIST S. I.).....	17
2.4.3 Beschreibende Statistik: Sensitivität, Spezifität, und der Cohens-Kappa.....	18
3 Ergebnisse .....	19
3.1 Studienpopulationen .....	19
3.2 Biosynex® Rapid Strip Test.....	20
3.2.1 Experiment an CxCa-Zelllinien.....	20

3.2.2	Sensitivität und Spezifität des Biosynex <sup>®</sup> Rapid Strip E7 16/18/45 .....	20
3.2.3	Konkordanz der Streifentestergebnisse zwischen Selsample und Arztsample .....	23
3.3	Mikrogen <sup>®</sup> E7 ELISA Test .....	23
3.3.1	Experiment an CxCa-Zelllinien .....	23
3.3.2	Sensitivität und Spezifität des Mikrogen <sup>®</sup> recomWell E7 ELISA (Selsamples) .....	23
3.3.3	Sensitivität und Spezifität des Mikrogen <sup>®</sup> recomWell E7 ELISA (Arztsamples) .....	24
4	Diskussion .....	27
4.1	Erkenntnisse .....	27
4.1.1	Biosynex <sup>®</sup> E7 Rapid Strip .....	27
4.1.2	Mikrogen <sup>®</sup> E7 ELISA .....	28
4.2	Limitationen .....	30
4.3	Aktuelle Entwicklungen und Ausblick .....	31
5	Literaturverzeichnis .....	34
	Eidesstattliche Versicherung .....	XL
	Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
	Danksagung .....	XLI

## Abkürzungsverzeichnis

ACOG.....	American College of Obstetricians and Gynecologists
AGC-NOS .....	Atypical glandular cells not otherwise specified
AGUS .....	Atypical glandular cells of undetermined significance
AIS .....	Adenocarcinoma in situ
ASC-US.....	Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance
AUTH.....	Aristoteles-Universität Thessaloniki
CIN .....	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
FDA.....	US Food and Drug Administration
GAR .....	Gold-Anti-Rabbit
hrHPV.....	High-Risk HPV
lrHPV .....	Low-Risk HPV
mRNA .....	Messenger Ribonukleinsäure
NPV .....	Negativer Predictiver Wert
OD .....	Optische Dichte
ORF .....	Open Reading Frame
Pap.....	Papanicolaou-Test
PPV.....	Positiver Predictiver Wert
URR.....	Upstream Regulatory Region

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: HPV-Prävalenz bei CxCa. HPV 16, 18 und 45 sind zusammen verantwortlich für 74,8 % der Zervixkarzinome weltweit [27].....	4
Tab. 2: Rekrutierung der Patientinnen .....	10
Tab. 3: Materialien zur Durchführung des Biosynex <sup>®</sup> Rapid Strip.....	14
Tab. 4: Cut-off-Werte für die Einschätzung der Ergebnisse von Mikrogen <sup>®</sup> recomWell E7 ELISA .....	16
Tab. 5: Verschlüsselung von ASSIST-Cytology-, -Colposcopy- und -Histology-Codes .....	17
Tab. 6: Eigenschaften der Kohorten.....	19
Tab. 7: Ergebnisse des Streifentests auf HeLa-, CaSki-, MS-751- und C33A-Zelllinien.....	20
Tab. 8: Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse des Biosynex <sup>®</sup> E7 Rapid Strip zur Erfassung von ASSIST S. I. 2+ bei hrHPV 16/18/45 DNA+ .....	22
Tab. 9: Konkordanzanalyse der Ergebnisse des Biosynex <sup>®</sup> E7 Rapid Strip zwischen Selfsample und Arztsample .....	23
Tab. 10: Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse des Mikrogen <sup>®</sup> E7 ELISA zur Erfassung von ASSIST 2+ für alle Arztsamples .....	26

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Organisation des Genoms von hrHPV 16 [12].....	2
Abb. 2: Delphi <sup>®</sup> -Screener Selsampler (Lavage) .....	13
Abb. 3: Evalyn <sup>®</sup> -Brush Selsampler (Bürste) .....	13
Abb. 5: Der Biosynex <sup>®</sup> -E7-Rapid-Strip-Ergebnismöglichkeiten.....	15
Abb. 6: Interpretation des ASSIST S. I. ....	18
Abb. 7: Cut-off-Wert gemäß Herstellerangaben des vermarkteten <i>recomWell</i> HPV 16/18/45....	32
Abb. 8: Sensitivitäten und Spezifitäten des vermarkteten <i>recomWell</i> HPV 16/18/45.....	32

## Zusammenfassung

### Hintergrund:

Der Status quo in der Diagnostik von zervikalen Dysplasien ist verbesserungswürdig. Die grundsätzlich verwendete Zytologie zeigt sich als diagnostisch ungenau, während der molekulare Nachweis von HPV z.B. mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zwar eine Infektion mit ‚high-risk‘ Humanen Papillomviren (hrHPV), aber keine Dysplasie erfassen kann. Es wurden zwei innovative E7 Onkoprotein-basierte Nachweissysteme, der Biosynex<sup>®</sup> E7 Rapid Strip und der Mikrogen<sup>®</sup> recomWell E7 ELISA entwickelt. In dieser Arbeit wurden sie explorativ evaluiert, anhand einer heterogenen Gruppe an Abstrichproben von Arzt- und Selsamples.

### Methoden:

Es wurden 44 Patientinnen einer Hochrisikokohorte und 190 Patientinnen einer Screeningkohorte rekrutiert. Jede Probe (Arzt- und Selsample) wurde mittels PCR genotypisiert und auf E7 Onkoprotein getestet. Zusätzlich wurden klinische Befunde der Zytologie, Kolposkopie und ggf. Histopathologie bereitgestellt. Die Sensitivität und Spezifität zur Erfassung vom definierten Krankheitszustand CIN 2+ für ‚hrHPV positive‘-Patientinnen wurden errechnet. Zudem wurde der Cohens-Kappa-Wert zur Beurteilung der Konkordanz zwischen den Ergebnissen des Selsamples und des Arztsamples bestimmt.

### Ergebnisse:

Der Biosynex<sup>®</sup> E7 Rapid Strip war nur unzureichend in der Lage, zervikale Dysplasien zu erfassen bei einer allgemein schwachen Sensitivität (0-50%) unabhängig von der untersuchten Kohorte. Der Mikrogen<sup>®</sup> recomWell E7 ELISA konnte zuverlässig zervikale Dysplasien verursacht durch hrHPV 16/18/45 in Arztsamples erfassen (100%). Die Selsamples beinhalteten zu wenig adäquates Zellmaterial, um ein valides ELISA-Ergebnis zu erzeugen.

### Schlussfolgerung:

Trotz des Versagens des Biosynex<sup>®</sup> E7 Rapid Strip scheint es Hoffnung beziehungsweise Alternativen bezüglich onkoproteinbasierter Schnellstreifentestverfahren zu geben. Der Mikrogen<sup>®</sup> recomWell HPV 16/18/45 wird aktuell vermarktet und stellt eine konkrete Alternative in einem Dysplasie-Screeningalgorithmus dar, vor allem als Triage Test nach einem positivem HPV-Test mit den Typen 16/18/45.

## Abstract

### Background:

The current possibilities in the detection of cervical dysplasia leave room for better diagnostic tools. The currently used cytology is considered as diagnostically inaccurate, while molecular HPV detection by PCR is capable only of detecting infection, being not informative about dysplasia. We undertook an explorative evaluation of two innovative E7 oncoprotein-based tests, i.e. the Biosynex E7<sup>®</sup> Rapid Strip and the Mikrogen<sup>®</sup> *recomWell* E7 ELISA, using a heterogeneous collection of cervical smears of physician-samples and self-samples.

### Methods:

44 patients were assigned to a high-risk cohort and 190 patients were assigned to a screening cohort. Each patient submitted an initial self-sample and secondly a physician-sample was obtained. Each sample was HPV genotyped and tested using the two E7 oncoprotein tests. Clinical data regarding the cytology, colposcopy, and histopathology status were made available for each patient. Sensitivity and specificity for the detection of defined dysplasia stages CIN2+ for hrHPV+ patients were calculated to assess the feasibility of the E7 oncoprotein tests. Furthermore, the Cohens-Kappa was used to evaluate concordance between results of self-samples to their respective physician-samples.

### Results:

The Biosynex<sup>®</sup> E7 Rapid Strip failed at effectively detecting cervical dysplasia, producing a generally weak sensitivity in all observed cohorts (0-50%). The Mikrogen<sup>®</sup> *recomWell* E7 ELISA could successfully detect cervical dysplasia caused by hrHPV 16/18/45 in physician-samples (sensitivity 100%). Self-samples did not contain sufficient cervical cells to produce valid ELISA results.

### Conclusion:

In spite of the failure of the Biosynex<sup>®</sup> E7 Rapid Strip, new developments give hope for oncoprotein-based rapid strip tests. The Mikrogen<sup>®</sup> *recomWell* HPV 16/18/45 has been successfully released to the market and represents a concrete alternative in a screening algorithm, especially as a triage test after a positive HPV test of types 16/18/45.



# 1 Einleitung

## 1.1 Humane Papillomviren

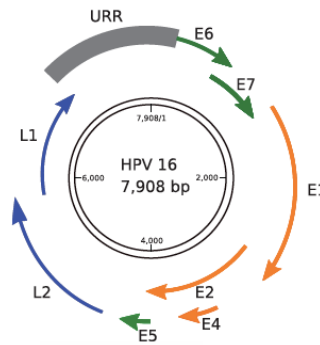
Papillomviren (PV) sind polyphyletische Viren, die kutane und mukosale Infektionen nicht nur bei Menschen, sondern auch bei einigen Vögeln, Schildkröten und wahrscheinlich allen Vertebraten verursachen [1]. Bis dato wurden mehr als 340 verschiedene PV-Typen an den Häuten und Schleimhäuten unterschiedlicher Lebewesen identifiziert. Sie werden nach der Klassifikation von de Villiers eingeteilt [2-4]. Die Familie der Papillomaviridae ist eine der sieben Familien humaner DNA-Viren und der älteste bekannte humane Tumorstoff [5]. Seit den ersten erfolgreichen Versuchen der Isolierung von PV aus humanem Epithelgewebe am Ende der 70er-Jahre [6, 7] wurden mehr als 200 HPV-Typen identifiziert [4].

### 1.1.1 Die Molekularbiologie von HPV

#### 1.1.1.1 Die Basisstruktur von HPV

PV sind kleine (40 bis 60 Nanometer Durchmesser) Viren mit unbehüllten ikosaedrischen Kapsiden, die ein Erbgut aus zirkulärer doppelsträngiger DNA haben. Das Genom hat eine Länge von circa 8 Kilobasen und ist in drei Hauptregionen eingeteilt:

1. Eine ‚Upstream-regulatory-Region‘ (URR), die transkriptionsfaktorbindende Regionen beinhaltet sowie die Genexpression kontrolliert.
2. Eine ‚Early Region‘, die für multiple Funktionen, wie z. B. die Virusreplikation und die Zelltransformation bedeutend ist. Das E1-Protein ist wichtig für die episomale Replikation. Das E2 ist ein Transkriptionsfaktor mit einem selbstlimitierenden Effekt, der in der initialen Phase der Infektion wenig exprimiert wird und somit die Translation der frühen Proteine beschleunigt. Bei der Teilung infizierter Zellen hingegen wird es hochreguliert und führt zu einer Unterdrückung der frühen Proteine [8, 9].
3. Eine ‚Late Region‘, die für die Kapsidbildung essenziell ist. Das L1-Protein ist der Hauptbestandteil des viralen ikosaedrischen Kapsids, das sich spontan zu virusähnlichen Partikeln zusammenlagert [10]. Zuletzt bindet das L2-Protein die zirkuläre DNA und verpackt sie in das Kapsid [11].



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Organisation des Genoms von hrHPV 16 [12]**

Die einzigen Elemente, die alle PV-Typen gemeinsam haben, sind die URR, die Frühproteine E1 und E2 sowie die Spätproteine L1 und L2 [13]. Theoretisch reichen diese vier Proteine aus, um die grundlegenden Funktionen, wie die Replikation, die Regulation, die Stabilisierung und das Verpacken der viralen DNA, durchzuführen [14].

#### **1.1.1.2 Die E6-E7-Region und ihre Pathogenität**

Abgesehen von den oben beschriebenen Elementen gibt es zwei weitere Regionen im HPV-Genom, die eine hohe Variabilität und ein breites Repertoire von ‚Open-reading-Frames‘ (ORFs) aufweisen: Diese sind die E6- und E7-Regionen, lokalisiert zwischen der URR und der E1-ORF und in der ‚hinge region‘ zwischen den E2- und L2-ORFs [13]. Diese Genloci kodieren für Proteine, die in der initialen Phase, noch vor der Differenzierung der infizierten Zelle, exprimiert werden [14]. Diese Proteine interferieren mit den Tumorsuppressoren, die einen physiologischen Zellzyklus kontrollieren. Die Interaktion führt zu einer unkontrollierten Proliferation des differenzierenden Keratinozyten [15, 16].

Das E7-Protein von hrHPV interagiert mit dem Produkt des Retinoblastomgens pRB, indem es die pRB-assoziierten Pocket-Proteine, die unter physiologischen Umständen den Transkriptionsfaktor E2F binden und somit hemmen würden, phosphoryliert und degradiert [17, 18]. Die resultierende Freisetzung von E2F forciert den Zellzyklus in die S-Phase und somit in die irreguläre Replikation [19]. Das E6-Protein von hrHPV degradiert das Tumorsuppressor-Protein p53 durch Ubiquitinierung mit anschließendem Abbau durch das 26S-Proteasom [15, 20]. Die Depletion von p53 resultiert in einer Verhinderung der Apoptose der infizierten Zelle [21].

Der kumulative Effekt von E6 und E7 ist essenziell für die Entstehung und die Proliferation dysplastischer Epithelzellen. Somit sind die zwei Proteine logische Ansatzpunkte für innovative Diagnostik und Therapiemöglichkeiten im Kampf gegen HPV-assoziierte Karzinome.

### **1.1.2 Der Krankheitswert von HPV-Infektionen**

Die meisten HPV-Infektionen verlaufen jedoch subklinisch und verursachen keine pathologischen mukokutanen Läsionen[22]. Wahrscheinlich sind die meisten Menschen in der Welt besiedelt mit HPV, ohne es zu merken[23]. Es wird geschätzt, dass ca. 75–80 % der sexuell aktiven Menschen bis zum fünfzigsten Lebensjahr eine HPV-Infektion des Genitaltrakts durchgemacht haben[24, 25]. Die intensive Forschung zu dem Thema wurde aber verständlicherweise nicht von den häufigen inapparenten Infektionen angetrieben, sondern von der Schwere der Verläufe mancher HPV-assoziiierter Erkrankungen, die im Folgenden beschrieben werden.

#### **1.1.2.1 Mukosale Infektionen mit HPV**

Am bedeutendsten hinsichtlich der mukosalen Infektionen ist das Zervixkarzinom (CxCa), das in 90–100 % der Fälle mit einer HPV-Infektion einhergeht [26] und jedes Jahr verantwortlich für den Tod von ca. 266000 Frauen weltweit ist[27]. Die Prävalenzen der jeweiligen HPV-Typen bei Zervixkarzinomen weltweit werden in Tab.1 nach Häufigkeit gelistet:

**Tab. 1: HPV-Prävalenz bei CxCa. HPV 16, 18 und 45 sind zusammen verantwortlich für 74,8 % der Zervixkarzinome weltweit [27].**

		Any histology			
Country Name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
World	1st	16	53309	55.4	(55.0-55.8)
	2nd	18	52798	14.6	(14.3-14.9)
	3rd	45	42447	4.8	(4.6-5.0)
	4th	33	47673	4.2	(4.1-4.4)
	5th	58	44887	3.8	(3.7-4.0)
	6th	31	46340	3.5	(3.4-3.7)
	7th	52	44083	3.4	(3.2-3.6)
	8th	35	43022	1.6	(1.5-1.8)
	9th	39	40312	1.4	(1.3-1.5)
	10th	59	40299	1.1	(1.0-1.2)

Andere anogenitale Karzinome mit geringeren Prävalenzen sind das Vulva-, Vaginal-, Penis- und Analkarzinom. Einen Anteil von 92 % der Vulvakarzinome bedingen die keratinisierenden Plattenepithelkarzinome, von denen 6 % HPV-assoziiert sind. Jedoch beträgt die HPV-Prävalenz 90 % bei vulvären intraepithelialen Neoplasien, basaloiden Karzinomen und warzigen Karzinomen der Vulva[28, 29]. Ähnlich sind basaloide und warzige Karzinome des Penis oft hrHPV-assoziiert, während eine hrHPV-Infektion selten auch mit keratinisierenden Plattenepithelkarzinomen und dem verrukösen Peniskarzinom einhergehen kann[30]. Außerdem sind 85 % der Vaginalkarzinome und 80–96 % der Analkarzinome hrHPV-assoziiert[31]. Eine persistierende hrHPV-Infektion ist zudem ein Hauptrisikofaktor mit zunehmender Bedeutung für die Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms. Eine Metaanalyse aus 2012 zeigte, dass sich die HPV-Prävalenz bei Kopf-Hals-Karzinomen in Nordamerika und Europa von 41 % in 2000 auf 72 % in 2004 signifikant erhöht hat[32].

Mukosale Infektionen mit low-risk Humanen Papillomviren (lrHPV), wie beispielsweise HPV 6 und 11, verursachen Papillome oder Warzen und sind hochkontagiös. Im anogenitalen Bereich äußern sie sich als Condylomata acuminata[33], eine der häufigsten Geschlechtskrankheiten weltweit. Diese Papillome, obwohl sie in der Regel nicht entarten, können einen erheblichen Morbiditätswert aufweisen, wenn sie ungünstig lokalisiert sind. Ein adäquates Beispiel dafür ist die rezidivierende respiratorische Papillomatose, die, obwohl sie selten auftritt, ein signifikantes Letalitätsrisiko darstellt. Die Papillome können stenosierend in den Atemwegen wachsen, auch

metastatisch in die unteren Atemwege streuen[34] und sind nur durch risikogebundene chirurgische Exzision behandelbar[35]. Eine andere seltene und benigne Form der mukosalen Manifestation von HPV-Infektionen ist die fokale epitheliale Hyperplasie (oder Morbus Heck), die durch HPV 13 und 32 verursacht wird. Diese Krankheit betrifft meistens nichtkaukasische Frauen und Kinder und ist häufig auf der unteren Lippe lokalisiert[36-38].

### **1.1.2.2 Kutane Infektionen mit HPV**

Aufgrund der geringeren klinischen Relevanz der meisten HPV-assoziierten kutanen Läsionen wird dieses Thema hier nicht im Detail beschrieben. HPV-Typen, die die Kutis infizieren, sind HPV 2, 3, 10, 27 und 57 des Alpha Genus, HPV 4, 60 und 65 des Gamma Genus und HPV 1 und 63 des Gamma Genus[39]. Diese Infektionen manifestieren sich als allgemeine Warzen, Plantarwarzen, flache Warzen, filiforme Warzen, pigmentierte Warzen oder epidermoide Zysten und sind in der Regel gutartig. Seltene Ausnahmen sind das verruköse Karzinom, das durch eine persistierende Plantarwarze entstehen kann[40], und die extragenitale Bowensche Krankheit, ein In-situ-Plattenepithelkarzinom der Kutis.

## **1.2 Das Zervixkarzinom**

### **1.2.1 Die Epidemiologie des Zervixkarzinoms**

Weltweit ist das CxCa das dritthäufigste und dritttödlichste Malignom bei Frauen, mit ca. 528000 Neuerkrankungen und ca. 266000 Todesfällen im Jahr 2012[27]. Ein Anteil von 84 % der CxCa-Diagnosen stammt aus Afrika, Asien und Südamerika[41]. Für Frauen aus Entwicklungsländern ist das CxCa der zweithäufigste Krebs (Inzidenz 15.7 von 100000 Frauen/Jahr) und die dritthäufigste krebssbedingte Todesursache (Inzidenz 8.3 von 100000 Frauen/Jahr)[27]. In Afrika und Zentralamerika ist das CxCa die häufigste krebssbedingte Todesursache. In westeuropäischen Ländern hat die Prävention mit dem Einsatz von HPV-Impfungen und mit dem Screening auf CxCa, CIN und HPV die Inzidenz und Mortalität des CxCa über 50 Jahre um ca. 75 % senken können[42, 43]. Im Jahr 2012 rangierte dort das CxCa auf Platz 11 der Inzidenzraten von Malignomen bei Frauen (9.9 von 100000 Frauen/Jahr) und auf Platz 9 der krebssassoziierten Mortalitätsraten (3.3 von 100000 Frauen/Jahr)[41]. In Deutschland betrug die Inzidenzrate 8.2 und die Mortalitätsrate 1.7.

## 1.2.2 Die histopathologische Einteilung des Zervixkarzinoms

In einer großen internationalen Metaanalyse zwischen 2001 und 2004 wurden mehr als 30.000 Zervixkarzinome histopathologisch eingeteilt[44]. Die Verteilung stellte sich wie folgt dar:

- Plattenepithelkarzinome – 69 %
- Adenokarzinome (inklusive adenosquamös) – 25 %
- Sonstige Histologien – 6 %

In den letzten Dekaden ist die Inzidenz von zervikalen Adenokarzinomen in Europa und in den USA vor allem bei jungen Frauen drastisch gestiegen[45, 46]. Verschiedene Hypothesen, die diesen Trend zu erklären versuchen, sind ein Anstieg der Prävalenz der Adenokarzinom-spezifischen HPV-16 und HPV-18 Genotypen in der Bevölkerung und die erhöhte Aussetzung mit Östrogenen, endogen (z. B. bei Adipositas) sowie exogen (z. B. bei hormoneller Kontrazeption und postmenopausaler Östrogen-therapie) [47]. Andere Tumore an der Zervix, die aber selten auftreten, sind neuroendokrine Karzinome[48], Sarkome[49], Rhabdomyosarkome[50] und Lymphome[51].

## 1.2.3 Der Krankheitsverlauf

Auf dem Weg von der Infektion mit hrHPV, meist durch Sexualkontakt, bis zum invasiven Zervixkarzinom werden vier Schritte durchlaufen[52]:

1. Infektion des metaplastischen Epithels in der zervikalen Transformationszone: Die Viren werden über direkten Schleimhautkontakt übertragen, die Kontagiosität ist vermutlich sehr hoch[53]. HPV-assoziierte Karzinome entstehen oft in der Transformationszone zwischen verschiedenen Epithelarten, wie am Übergang des nichtverhornenden Plattenepithels der Portio vaginalis (ektozervix) zum endozervikalen Zylinderepithel[54]. Die Gründe hierfür konnten bisher nicht hinreichend erklärt werden.
2. Viruspersistenz: Die meisten Infektionen werden innerhalb der ersten 2 Jahre nach der Infektion erfolgreich durch die zelluläre Immunantwort unterdrückt[55]. Etwa 10 % der Neuinfektionen persistieren [52].
3. Progression von persistent infizierten Zellklonen in eine Präkanzerose: Von den länger als 2 Jahre persistierenden karzinogenen Infektionen entwickelt ein hoher Anteil eine Präkanzerose[56]. Als zervikale Präkanzerose gelten eine CIN 3, ein CIS, eine schwere Dysplasie oder eine Dyskaryose.

4. Entwicklung eines Karzinoms und Durchbrechen der Basallamina zum invasiven Zervixkarzinom: Aktuelle Daten zum Ausmaß des Risikos für den Progress einer Präkanzerose ins Karzinom sind schwer zu finden, da die Forschung zur Invasion ethisch schlecht vertretbar ist. Ältere Studien benennen dieses Risiko einer Invasion der Präkanzerose über einen Zeitraum von 5 bis 10 Jahren mit 20–30 % [57, 58].

## **1.3 Die Erfassung einer zervikalen Dysplasie**

### **1.3.1 Die Zytopathologie, die Kolposkopie und die Histopathologie**

Die gängigste Methode zur Erkennung von zervikalen Präkanzerosen und Vorstufen ist der 1941 entwickelte Papanicolaou-Test (Pap-Abstrich) [59]. Die Entwicklung und die Implementierung von landesweiten Screeningprogrammen haben das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko gesenkt. Das Screening wird im Rahmen der einmal jährlichen Vorsorgeuntersuchung in allen gynäkologischen Kliniken und Praxen in Deutschland durchgeführt. Im Idealfall werden beim Abstrich nach Papanicolaou Zellen der Transformationszone mittels einer endozervikalen Bürste und eines ektozervikalen Holzspatels gewonnen [60]. Beim konventionellen Pap-Abstrich wird das Zellmaterial auf einem Objektträger in 95 % Ethylalkohol plus Ethylether oder ausschließlich 95 % Ethylalkohol fixiert und beim LBC („liquid based cytology“) mit z. B., ThinPrep® PreservCyt®-Lösung fixiert. Anschließend werden die Objektträger mit dem Zellmaterial mikroskopisch nach Atypien untersucht. Weltweit werden die Befunde meistens durch das Bethesda-System eingeteilt, das 1988 eingeführt [61] und zuletzt 2001 revidiert [62] wurde. In Deutschland werden die zytopathologischen Befunde seit 2014 nach der Münchner Nomenklatur III klassifiziert [63]. Der Nachteil des zytologischen Screenings ist die niedrige Sensitivität des Tests; eine CIN 2+ Sensitivität von 59% wurde 2008 durch Cuzick et al beschrieben [64]. Eine signifikante Inter-Observer-Variabilität wird auch beobachtet, obwohl sie bei höheren Krankheitsstadien abnimmt [65].

Die Kolposkopie ist eine 1925 beschriebene [66] diagnostische Prozedur, in der ein Kolposkop (Mikroskop) eine vergrößerte und illuminierte Sicht der Ektozervix sowie eine gezielte Biopsie der zervikalen Mukosa ermöglicht. Sie eignet sich nicht als alleiniges Screeningmittel [67], aber gilt als Goldstandard für den Follow-up-Test nach einem positiven Pap-Befund und/oder einem positivem HPV-Test [68]. Der kolposkopische Befund basiert auf visuellen Veränderungen (Farbe, vaskuläre Muster und Abgrenzung) und Geruchsabnormitäten, die nie pathognomonisch für eine zervikale Präkanzerose oder ein zervikales Karzinom sind. Deswegen benötigt ein Arzt

für die Sicherung einer CIN oder eines CxCa unbedingt eine Biopsie mit einem entsprechenden histopathologischen Befund. Die Sensitivität und die Spezifität der Kolposkopie richten sich wesentlich nach der Erfahrung und dem Können des Arztes. Eine gute Inter-Observer-Reliabilität wird beobachtet bei erfahrenen Ärzten für die Diagnosestellung von normalem Epithel, CIN 2, 3 und CxCa [69]. Es wird mehr Inter-Observer-Variabilität für die Diagnosestellung von CIN 1 beobachtet, obwohl man beachten muss, dass es in diesen Fällen auch histopathologisch eine größere Variabilität gibt [70].

In dieser Studie wurde für die Beurteilung des Schweregrads der vorliegenden Dysplasie der sogenannte ASSIST S.I. (Severity Index) verwendet. Dieser score wurde im EU Projekt ASSIST (Association Studies aSsisted by Inference and Semantic Technologies) entwickelt und vereinigt gewichtet die diagnostischen Ergebnisse aus der Zytologie, Kolposkopie und Histologie, die zu einer Patientin vorliegen [71]. Die Vorgehensweise wird in 2.4.1 im Detail erläutert.

### **1.3.2 DerhrHPV-DNA-Nachweis**

Die hrHPV-DNA-Testung ist eine effektive Methode zur Früherkennung eines Zervixkarzinoms, da sie eine Infektion mit hrHPV mit hoher Genauigkeit noch vor der Entstehung einer Dysplasie erkennen kann. Mehrere Studien zeigten eine höhere Sensitivität und niedrigere Spezifität des Tests im Vergleich zur Zytologie [72, 73] und eine Überlegenheit, wenn die Testung in Kombination mit der Zytologie (Co-Testing) durchgeführt wurde im Vergleich zur Testung nur per Zytologie [74]. Da aber viele hrHPV-Infektionen bei jungen Frauen selbstlimitierend verlaufen und die HPV-Prävalenz in der Altersgruppe teilweise sehr hoch ist, verursacht der HPV-Test eine Überdiagnostizierung von regressiven CIN-2-Histopathologien bei jungen Patientinnen [75]. Aufgrund dessen empfiehlt das American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) das Screening per Co-Testing nur bei Frauen über 29 Jahren und einmal alle 5 Jahre (Empfehlungsgrad A) [76]. Am 24. April 2014 erfolgte die Zulassung des ersten HPV-Tests (cobas<sup>®</sup>) durch die Food and Drug Administration der Vereinigten Staaten von Amerika (FDA). Inzwischen wurden mehr als 125 Assays entwickelt [77].

### **1.3.3 hrHPV-E7-Onkoprotein als diagnostischer Ansatz, PIPAVIR und Selsamples**

Die schwache Genauigkeit der Zytologie, die hohe Interrater-Variabilität der Kolposkopie und die Unfähigkeit des HPV-Tests, zwischen einer Infektion und einer Dysplasie zu unterscheiden, schafft Raum für neue Ansätze in der Forschung. Die E6- und E7-Onkoproteine



als Marker sind aufgrund ihrer zentralen Rolle in der frühen Karzinogenese eine konkrete Alternative zu den konventionellen Methoden, um Patientinnen mit einem positiven hrHPV-DNA-Status, die jedoch tatsächlich an einer Dysplasie erkrankt sind, zu erfassen. Beispielsweise wurde die Messung von E6- und E7-mRNA in mehreren Studien als zuverlässiges Mittel für die Entdeckung von HSIL und CxCa beschrieben [78, 79].

PIPAVIR („Persistent Infections by PApillomaVIRus“) ist ein EU-finanziertes Projekt (European Union's Seventh Programme for research, under grant agreement No [304927]) und eine Zusammenarbeit der Universität Innsbruck, Mikrogen GmbH, Biosynex SA, Charité Universitätsmedizin Berlin und von Aristotelio Panepistimio Thessalonikis. Das Konsortium hat zwei E7-Testsysteme, den **Mikrogen® E7 ELISA** Test für die Messung vom E7-Onkoprotein von 12 hrHPV Typen und den **Biosynex® E7 RapidStrip** für die Erfassung von hrHPV 16/18/45 E7, klinisch evaluiert [80]. Teil des Projekts ist die Evaluation der genannten Testungen anhand selbstständig entnommener Proben (Selsamples). Wir befassten uns ausschließlich mit den Daten von den Frauen, die im Rahmen dieser Selsampling-(Sub-)Studie rekrutiert wurden. Zervikovaginales Selsampling ist die eigenständige Probenentnahme durch die Patientin, beispielsweise in Form eines Abstrichs oder einer Spülung. Im Kampf gegen das CxCa ist es zentral, den Anteil an Frauen, die nicht am Screening teilnehmen, zu minimieren. Der Vorteil des Selsampling ist eine erhöhte Reichweite des Screenings [81]. Die E7-Nachweissysteme in Kombination mit Selsampling ermöglichen ein zentralisiertes Diagnostikverfahren ohne den Einsatz eines Arztes. Die Machbarkeit eines E7 Onkoprotein-Nachweisverfahrens mittels Selsample wurde bisher nicht technisch validiert. Eine Metaanalyse aus 2014 von M. Arbyn konnte jedoch das zervikovaginales Selsampling in Kombination mit PCR-basierten HPV-DNA-Testsystemen als Routinescreening empfehlen [82].

## 1.4 Fragestellung

Das Ziel dieser Dissertation ist es, einen orientierenden Eindruck der Funktionstüchtigkeit des Biosynex® E7 Rapid Strip Tests und des Mikrogen® *recomWell* E7 ELISA Test zu erlangen. Diese Einschätzung bezieht sich auf die Evaluation der Sensitivität und Spezifität zur Erfassung von ASSIST S. I. 2+ nach einem nachgewiesenen positiven hrHPV-DNA-Status. Es wurden Selsamples und Arztsamples zum Teil selbst rekrutiert und zum Teil von PIPAVIR-Partnern erhalten. Da zu jeder rekrutierten Patientin ein Arztsample und ein Selsample vorliegt, gilt es als weiteres Ziel, die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen Selsamples und Arztsamples zu beurteilen.

## 2 Methoden und Materialien

Der folgende Abschnitt beschreibt die methodische Herangehensweise zur Beantwortung der Fragestellung. Dabei wird auf die Rekrutierung von Patientinnen, das Arzt- und Selsampling sowie die Auswertung der Befunde eingegangen.

### 2.1 Studiendesign und Patientinnenrekrutierung

Es wurden 234 Frauen aus einem Hochrisiko- und einem Screening-Setting rekrutiert. Dies erfolgte an zwei Standorten, nachdem die Genehmigung seitens der jeweiligen Ethikkommissionen eingeholt worden war (Ethikvotum-Nummer EA1/168/13):

**Tab. 2: Rekrutierung der Patientinnen**

<b>Standort</b>	<b>Berlin Charité</b>	<b>Thessaloniki AUTH</b>
<b>Patientinnen</b>	44 Risiko-Patientinnen	190 Screening-Patientinnen
<b>Selsampler</b>	Evalyn <sup>®</sup> Brush und Delphi <sup>®</sup> Screener	Evalyn <sup>®</sup> Brush (Bürste)

#### 2.1.1 Ablauf – Hochrisikokohorte

Zwischen April 2014 und Januar 2015 kontaktierten wir per Telefon 60 Patientinnen der Charité Universitätsmedizin Berlin die einen Termin in der Hochschulambulanz zur ‚Dysplasiesprechstunde‘ aufgrund eines auffälligen zytologischen und/oder HPV-DNA-Befundes hatten. Bei Erfüllung der Ein- und Ausschlusskriterien wurde die Patientin zur Teilnahme an die PIPAVIR-Studie eingeladen. Letztendlich wurden 42 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. Jede Frau bekam ein Selsampling-Kit (Selsampler, PIPAVIR-Einwilligungserklärung, PIPAVIR-Fragebogen, PIPAVIR-Aufklärungsbogen und einen vorfrankierten Rücksendeumschlag) per Post zugeschickt mit der Bitte, die Probe nach der Entnahme zurück ins Tumorummunologie-Labor der Klinik für Gynäkologie am Charité Campus Benjamin Franklin zu schicken. Die Patientinnen der Risikokohorte verwendeten zwei Arten von Selsampler. Die ‚Evalyn<sup>®</sup> Brush‘ verwendeten 23 Patientinnen und 19 Patientinnen verwendeten einen ‚Delphi<sup>®</sup> Screener‘-Selsampler. Der behandelnde Arzt entnahm zwei Proben (Arztsamples, eine Probe in ThinPrep<sup>®</sup>-Lösung und eine Probe in DIMA<sup>®</sup>-Lösung (eigene Lyse-Puffer Lösung der Firma Biosynex<sup>®</sup>)), die anschließend ins Tumorummunologie-Labor verschickt wurden. Alle Proben, außer den Evalyn<sup>®</sup>-Brush-Selsamples, wurden gemäß den

Herstellerangaben bei +4 Grad Celsius gelagert. Die Evalyn<sup>®</sup>-Brush-Selfsamples wurden entsprechend bei -20 Grad Celsius gelagert.

### **2.1.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien – Hochrisikokohorte**

Einschlusskriterien:

- Patientin mit Überweisung vom Arzt aufgrund mindestens einmaligem positivem hrHPV-/Zytologie-/Kolposkopie-/Histopathologie-Ergebnis.
- Frau im Alter von 25 bis 60 Jahren mit Termin in der Dysplasiesprechstunde des Charité Universitätsmedizin Campus Mitte
- Vorliegendes Einverständnis der Patientin

Ausschlusskriterien:

- Schwangerschaft
- Konisation/Hysterektomie in der Vorgeschichte

### **2.1.2 Ablauf – Screeningkohorte**

Patientinnen der Aristoteles-Universität Thessaloniki (AUTH) mit einem Termin zur jährlichen Krebsvorsorge wurden durch unsere PIPAVIR-Partnerin der Screening-Klinik zur Teilnahme an die PIPAVIR-Studie eingeladen und bei Interesse zur Studie aufgeklärt. Die 190 teilnehmenden Patientinnen bekamen einen PIPAVIR-Aufklärungsbogen und unterschrieben die Einwilligungserklärung. Die Selfsamplers der Art, Evalyn<sup>®</sup>-Brush‘ wurden in der Klinik zur Selbstbeprobung vor der ärztlichen Untersuchung bereitgestellt. Zwei Proben (Arztsamples, eine Probe in ThinPrep<sup>®</sup>-Lösung und eine Probe in DIMA<sup>®</sup>-Lösung) wurden anschließend durch den behandelnden Arzt entnommen. Alle Proben (Selfsamples und Arztsamples) wurden per schnellem und gekühltem Versand in das Tumorummunologie-Labor der Klinik für Gynäkologie der Charité Campus Benjamin Franklin geschickt. Alle Proben, außer den Evalyn<sup>®</sup>-Brush-Selfsamples, wurden bei +4 Grad Celsius gelagert. Die Evalyn<sup>®</sup>-Brush-Selfsamples wurden bei -20 Grad Celsius gelagert.

#### **2.1.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien – Screeningkohorte**

Einschlusskriterien:

- Frau im Alter von 30 bis 60 Jahren mit Termin zum Dysplasiescreening

- Vorliegendes Einverständnis der Patientin

Ausschlusskriterien:

- Schwangerschaft
- Konisation/Hysterektomie in der Vorgeschichte

## **2.2 Entnahme einer zervikovaginalen Probe**

### **2.2.1 Die Probenentnahme durch einen Gynäkologen (Arztsample)**

Bei jeder Patientin der Screening- und Hochrisikokohorte wurde nach einer klinischen Untersuchung (Pap-Abstrich, Kolposkopie und ggf. Probenbiopsie zur histopathologischen Untersuchung) zwei Proben (Arztsamples) für die PIPAVIR-Studie durch den behandelnden Arzt oder die behandelnde Ärztin entnommen; eine sogenannte ThinPrep<sup>®</sup>-Probe und eine DIMA<sup>®</sup>-Probe.

Zur Entnahme der ThinPrep-Probe<sup>®</sup> wurden eine Cytobrush für einen endozervikalen Abstrich und ein Cervex-Besen für einen ektozervikalen Abstrich bereitgestellt. Beide Bürsten sollten dann gegeneinander in einem mit Thinprep-Lösung vorgefülltem Gefäß ausgestrichen werden. Anschließend wurde eine zweite DIMA<sup>®</sup>-Probe entnommen. Dafür wurden eine Cytobrush<sup>®</sup>, ein DIMA<sup>®</sup>-Röhrchen mit 500 Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ) DIMA<sup>®</sup>-Puffer A und eine Tropfflasche mit DIMA<sup>®</sup>-Puffer B bereitgestellt. Die Bürste sollte nach einem endozervikalen Abstrich für 2 Minuten im DIMA<sup>®</sup>-Röhrchen gegen die Innenwand abgerieben werden, damit sich möglichst viel Material ablöst. Nach den 2 Minuten wurden 13 Tropfen (ca. 500  $\mu\text{l}$ ) DIMA<sup>®</sup>-Puffer B hinzugefügt und vermischt.

### **2.2.2 Selfsampling per Lavage (Delphi<sup>®</sup> Screener)**

Circa die Hälfte der Risikokohorte benutzte das Selbstabnahmegerät der Firma Delphi Bioscience B. V. (Scherpenzeel, Niederlande) Das Gerät wird in Abb. 4 dargestellt. Es enthält 5 Milliliter (ml) einer sterilen isotonischen Kochsalzlösung, die bei Knopfdruck die Zervix und Vagina nach Einführung durchspült und bei Loslassen wieder vom Sampler aufgenommen wird. Die Flüssigkeit wurde nach der Entnahme durch das erneute Betätigen des Knopfes in einen beigelegten Behälter überführt. Der Sampler wurde danach entsorgt und die Probe ins Labor geschickt. Dort wurde die Probe in ThinPrep<sup>®</sup>-Lösung fixiert und bei +4 Grad Celsius gelagert.

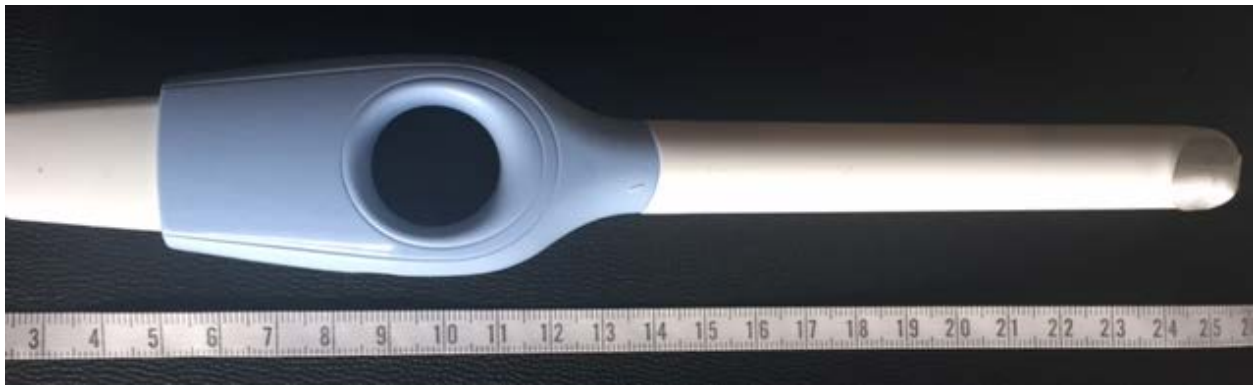


Abb. 2: Delphi®-Screener Selsampler (Lavage)

### 2.2.3 Selsampling per Bürste (Evalyn® Brush)

Die Patientinnen der Screeningkohorte und circa die Hälfte der Patientinnen der Hochrisikokohorte benutzten den Selsampler ‚Evalyn®-Brush‘ der Firma Rover Medical Services B. V. (Oss, Niederlande) Die Patientinnen konnten mit dem Gerät einen Abstrich des Cervicovaginalraums bei sich selbst durchführen. Die Bürste wurde samt Sampler in das Tumorummunologie-Labor geschickt, wo sie bei -20 Grad Celsius gelagert wurde.



Abb. 3: Evalyn®-Brush Selsampler (Bürste)

## 2.3 Testungen

### 2.3.1 Der Biosynex® Rapid Strip E7 Test

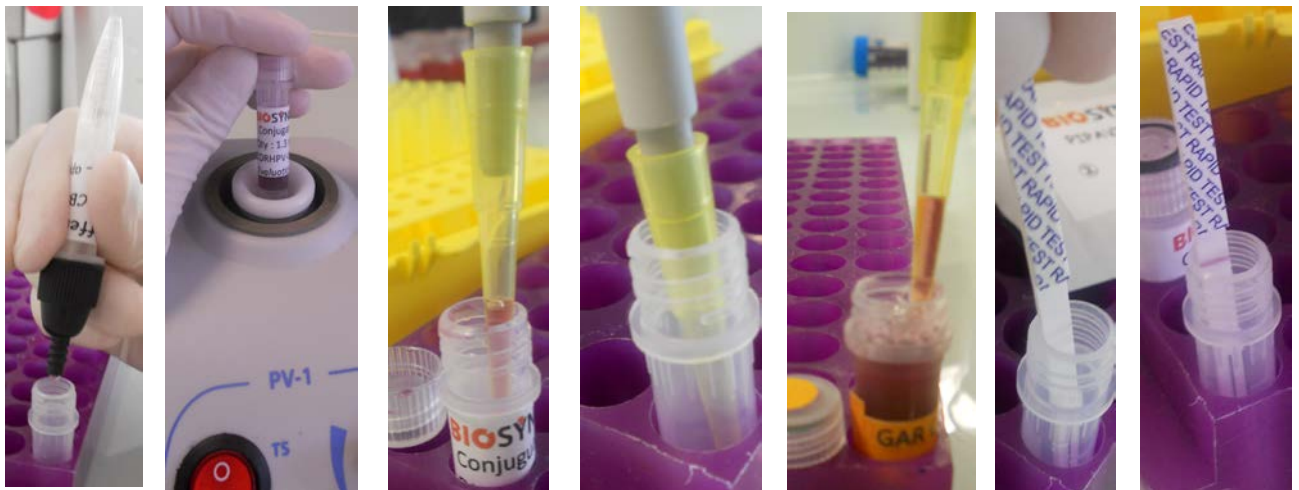
Der Prototyp des hrHPV-E7-Rapid-Strip-Tests wurde von der Firma Biosynex SA (Strasbourg, Frankreich) hergestellt. Wir führten diesen Streifentest an allen Arztsamples und ihren korrespondierenden Selsamples durch. Außerdem wurden vor der Anwendung an unseren klinischen Proben Zellreihen, die positiv auf hrHPV 16/18/45 waren, mit dem Streifentest untersucht.

In Tabelle 3 sind die von der Firma Biosynex SA bereitgestellten Materialien aufgelistet:

**Tab. 3: Materialien zur Durchführung des Biosynex® Rapid Strip**

Material	Funktion
PIPAVIR-hrE7-Streifenprototyp	
PIPAVIR-Puffer A	Puffer mit einem pH-Wert von 13 zum Lysieren des Zellmaterials
PIPAVIR-Puffer B	Puffer mit einem pH-Wert von 8 zum Neutralisieren des Lysats
Liquid-Gold-Conjugate	Beinhaltet Goldpartikel, gekoppelt an einen Mix von HPV16,18 und 45 E7 spezifischen RabMabs
Liquid-GAR-Conjugate	Beinhaltet Goldpartikel, gekoppelt an Goat-anti-Rabbit-Antikörper zur Signalverstärkung
N-Acetyl-Cystein &CaCl <sub>2</sub>	Verbessert den Migrationsfluss durch eine Verringerung der Viskosität
Reagenzröhrchen	

### 2.3.1.1 Testprotokoll



**Abb. 4: Einzelne Schritte des Biosynex® E7 Rapid Strip Test**

(A) (B) (C) (D) (E) (F) (G)

Im folgenden wird der Ablauf der Auswertung des Biosynex® E7 Rapid Strip Tests erläutert. Die Buchstaben in Klammern beziehen sich auf die Teilabbildungen aus Abbildung 4:

- 1) Die Materialien auf Raumtemperatur bringen
- 2) 10µl vom N-Acetyl-Cystein und 10µl vom CaCl<sub>2</sub> ins Reagenzröhrchen pipettieren
- 3) Probe vortexen und 3 Tropfen/100µl ins Reagenzröhrchen eingeben (A)
- 4) Mischung 2 Minuten reagieren lassen

- 5) Das Liquid-Gold-Conjugate im Vortexmischer vermischen (B)
- 6) 50µl des Liquid-Gold-Conjugate in das Reagenzröhrchen hinzufügen (C)
- 7) Die Mischung leicht vermischen durch mindestens dreimaliges Aufziehen und Entleeren mit der Pipette (D)
- 8) 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen
- 9) Das Liquid-GAR-Conjugate im Vortexmischer mindestens 30 Sekunden vermischen
- 10) 50µl des Liquid-GAR-Conjugate in das Reagenzröhrchen hinzufügen (E)
- 11) Sofort den Teststreifen in das Reagenzröhrchen legen
- 12) Bei Raumtemperatur inkubieren lassen (G) (Chromatographie Schritt) und Ergebnisse nach 15 Minuten und 30 Minuten ablesen

### 2.3.1.2 Interpretation der Ergebnisse




	Control-Line	Test-Line	
	Control-Line	Test-Line	Invalid (no Control-Line)
	Control-Line	Test-Line	Negative
	Control-Line	Test-Line	Positive

Abb. 5: Der Biosynex®-E7-Rapid-Strip-Ergebnismöglichkeiten

Am Ende des Protokolls wurden die zwei Linien auf dem Teststreifen, die Kontrolllinie und die Testlinie, abgelesen. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde eine Farbskala verwendet, um das Ergebnis semiquantitativ einzuschätzen.

### 2.3.2 Der Mikrogen® recomWell ELISA E7 Test

Der Mikrogen® recomWell E7 ELISA wurde von der Firma Mikrogen SA (Neuried, Deutschland) entwickelt und durchgeführt. Er ist ein Sandwich-ELISA-Test, der auf firmeneigenen monoklonalen Antikörpern aus Kaninchen und Ziegen gegen das E7-Protein von zwölf der wichtigsten hrHPV-Typen (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) basiert. VierhrHPV-E7-Antikörperkombinationen wurden verwendet, um fünf Testsysteme (recomWells) zu entwickeln (siehe Tab. 4). Für die Erkennung von E7 16/18/45 wurde ein Testsystem mit einer hohen Konjugatkonzentration ( $KJ_{high}$ ) und ein anderes Testsystem mit einer niedrigen Konjugatkonzentration ( $KJ_{low}$ ) verwendet.

Um die Validität der Proben zu testen beziehungsweise um zu prüfen, ob die Proben genügend zelluläres Material der Patientin beinhalten, wurde ein zusätzliches Testsystem zur Erfassung von zervixspezifischem Keratin entwickelt. Eine Probe galt als invalide, wenn der Keratinwert unter 0.1 Optische Dichte (OD) lag. In dem Fall ist anzunehmen, dass die Probe zu wenige Zervixzellen für ein valides E7-Ergebnis enthält.

Zur Auswertung unserer Daten bezogen wir uns auf die Cut-off-Werte nach Agorastos et al. (siehe Abb. 15). Diese Cut-offs wurden an den jeweiligen ‚real OD value‘ beziehungsweise den OD-Wert nach Abzug des Hintergrund-OD-Wertes appliziert.

**Tab. 4: Cut-off-Werte für die Einschätzung der Ergebnisse von Mikrogen® recomWell E7 ELISA**

<b>ELISA Testsystem</b>	<b>Cut-off /OD</b>
<i>recomWell HPV 16/18/45 KJ<sub>high</sub></i>	-0.0205*
<i>recomWell HPV 39/51/56/59</i>	0.0055
<i>recomWell HPV 16/31/33/35/52/58</i>	0.0075
<i>recomWell HPV HR screen</i>	-0.0565*
<i>recomWell HPV 16/18/45 KJ<sub>low</sub></i>	0.0085

\* Die ‚real corrected OD values‘-Ergebnisse des ELISA Tests sind kontinuierlich und befinden sich teilweise im negativen Bereich. Dies ist dadurch erklärt, dass von den Rohwerten (Raw-OD-Values) ein Hintergrundwert abgezogen wird.

### **2.3.3 GP5+/6+-PCR und Genotypisierung mittels Luminex-Technologie**

Zum Nachweis von HPV-DNA wurde das klinisch validierte L1-basierte PCR-Verfahren mit anschließender Genotypisierung mittels Luminex®-xMAP®-Technologie im Tumormikrobiologie-Labor der Klinik für Gynäkologie der Charité und durch den PIPAVIR-Partner in Thessaloniki durchgeführt. Die Testmethode wurde von Schmitt et al. erstmalig beschrieben [83] und wurde intern adaptiert, um 18 hrHPV-Typen (HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 und 82) erfassen zu können. Alle Arztsamples und Selsamples wurden auf HPV-DNA auf dieser Art untersucht.

## **2.4 Auswertung**

### **2.4.1 Vereinheitlichung von Zytologie, Kolposkopie und Histopathologie mittels ASSIST-Coding**

Da jede Patientin klinisch untersucht wurde, liegt auch ein Pap- sowie ggf. ein Kolposkopie- und/oder ein histopathologischer Befund vor. Die ASSIST-Herangehensweise nach Agorastos et al. [71] wurde verwendet, um die klinischen Befunde zu vereinheitlichen, da nicht immer die



gleiche Diagnostik bei jeder Patientin durchgeführt wurde und die drei Arten der konventionellen Diagnostik nicht einen gleichwertigen Positiven Prediktiven Wert (PPV) beziehungsweise Negativen Prediktiven Wert (NPV) besitzen. Im ersten Schritt wurden die Ergebnisse der Zytologie, Kolposkopie und Histopathologie in ASSIST-Cytology-Codes, ASSIST-Colposcopy-Codes und ASSIST-Histology-Codes kodiert (siehe Tab. 5).

**Tab. 5: Verschlüsselung von ASSIST-Cytology-, -Colposcopy- und -Histology-Codes**

<b>ASSIST-Cytology</b>	<b>Zytologie-Befunde</b>
<b>0</b>	Normale Zellen, PAP I, PAP II, Metaplasie, Infektion, Regeneration und Atrophie
<b>1</b>	Atypie, koilozytische Atypie, ASC-US, PAP IIw, PAP IIk, PAP III, PAP IIID, milde Dyskaryose, milde Dysplasie, LSIL, CIN 1, AGUS und AGC-NOS
<b>2</b>	ASC-H, PAP IIIG, PAP IVa, PAP IVb, moderate Dyskaryose, schwere Dyskaryose, moderate Dysplasie, schwere Dysplasie, HSIL, CIN 2, CIN 3, AIS und AGC-FN
<b>3</b>	PAP V, zelluläre Veränderungen hinweisend auf ein SCC, Adenokarzinom oder anderes invasives Zervixkarzinom
<b>ASSIST-Colposcopy</b>	<b>Kolposkopie-Befund nach der Rio-Klassifikation</b>
<b>0</b>	Normale Kolposkopie-Befunde
<b>1</b>	Leichtgradig abnormale Befunde
<b>2</b>	Hochgradig abnormale Befunde
<b>3</b>	Befunde verdächtig auf invasives Karzinom
<b>ASSIST-Histology</b>	<b>Histopathologie-Befunde</b>
<b>0</b>	Normales Zervixepithel, Metaplasie, Infektion, Hyperplasie, und Atrophie
<b>1</b>	Condyloma, koilozytische Atypie, Atypie, milde Dysplasie, Low-Grade-Dysplasie und CIN 1
<b>2</b>	Mittelschwere Dysplasie, CIN 2, schwere Dysplasie, High-Grade-Dysplasie, CIN 3, CIS und AIS
<b>3</b>	SCC und invasives Adenokarzinom der Zervix Uteri

#### **2.4.2 ASSIST-Severity-Index (ASSIST S. I.)**

Aus den ASSIST-Cytology-, ASSIST-Colposcopy- und ASSIST-Histology-Codes wurde für jede Patientin ein ASSIST-Severity-Index (S. I. = 0–3) errechnet, deren Einordnung des Malignitätsrisiko der Patientinnen erlaubt und sich als Parameter zur Entscheidungsfindung in dem klinischen Management dieser Patientinnen eignet. Die ASSIST-prozedurale Logik zur Definition des ASSIST S. I. lief wie folgt:

1. Um einen ASSIST S. I. zu errechnen, muss ein ASSIST-Cytology-Code, ASSIST-Colposcopy-Code und/oder ASSIST-Histology-Code verfügbar sein.

2. Falls zwei oder mehr ASSIST-Codes verfügbar sind und falls es eine Diskrepanz von 2 oder mehr zwischen zwei ASSIST-Codes gibt, ist der ASSIST S. I. definiert als der größte Index zwischen beiden Codes.
3. Falls Punkt 2 nicht der Fall ist und falls ein ASSIST-Histology-Code verfügbar ist, ist der ASSIST S. I. definiert als der ASSIST-Histology-Code.
4. Falls Punkt 3 nicht der Fall ist und falls ein ASSIST-Colposcopy-Code verfügbar ist, ist der ASSIST S. I. definiert als der ASSIST-Colposcopy-Code.
5. Falls Punkt 4 nicht der Fall ist und falls ein ASSIST-Histology-Code verfügbar ist, ist der ASSIST S. I. definiert als der ASSIST-Histology-Code

(a) Normal (+ Within Normal Limits)	<b>Assist code = 0</b>
(b) Low Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (LCIN)	<b>Assist code = 1</b>
(c) High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (HCIN)	<b>Assist code = 2</b>
(d) Invasive Cervical Cancer	<b>Assist code = 3</b>

**Abb. 6: Interpretation des ASSIST S. I.**

### 2.4.3 Beschreibende Statistik: Sensitivität, Spezifität, und der Cohens-Kappa

Im Falle eines Testverfahrens zur Erfassung einer Krankheit gibt die Sensitivität den Anteil an tatsächlich Kranken an, bei denen auch die Krankheit erfasst wurde. Die Spezifität gibt den Anteil der Gesunden an, bei denen auch keine Krankheit erfasst wurde. Als tatsächlich krank wurden Patientinnen bewertet, die einen ASSIST S. I. von 2 oder mehr aufwiesen. Dazu musste die Probe der Patientin einen positiven hrHPV-Status (positiv auf mindestens einen hrHPV-Typ im jeweiligen Spektrum des E7-Nachweissystems) aufweisen.

Zur Beurteilung der Konkordanz der Ergebnisse zwischen Selsample und Arztsample derselben Patientin wurde der Cohens-Kappa verwendet. Der Kappa-Koeffizient beurteilt die Übereinstimmung zweier Beurteilungen durch eine Maßzahl, unter Berücksichtigung der Zufallsübereinstimmung. Die Gleichung des Cohens-Kappa lautet, 
$$\kappa = \frac{p_0 - p_c}{1 - p_c}$$

wobei  $p_0$  der gemessene Übereinstimmungswert der beiden Nachweisverfahren und  $p_c$  die zufällig erwartete Übereinstimmung ist. Wenn die Rater in allen ihren Urteilen übereinstimmen, ist  $\kappa=1$ . Sofern sich nur Übereinstimmungen zwischen den beiden Ratern feststellen lassen, die mathematisch dem Ausmaß des Zufalls entsprechen, ist  $\kappa=0$ . Negative Werte weisen dagegen auf eine Übereinstimmung hin, die noch kleiner ist als eine zufällige Übereinstimmung.

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der beiden E7-Testverfahren dargestellt. Zunächst werden aber die zwei Studienpopulationen beschrieben.

#### 3.1 Studienpopulationen

Zwei Populationen, eine Screening- und eine Hochrisikokohorte wurden in Thessaloniki, Griechenland, und in Berlin, Deutschland, zum Zweck dieser Studie rekrutiert. In der Zeit zwischen August 2014 und März 2015 konnten insgesamt 233 Patientinnen in die Studie eingeschlossen werden.

Es wiesen 69.8 % der Patientinnen der Hochrisikokohorte versus 20.5 % der Patientinnen der Screeningkohorte hrHPV-DNA in ihren Arztsamples auf. In der Screeningkohorte hatten 95.8 % der Frauen einen unauffälligen Befund in der Zytologie/Kolposkopie/Histopathologie. Ferner ist der Anteil an Patientinnen mit milden oder schweren Dysplasien (ASSIST S. I.2+) in der Screeningkohorte sehr gering gewesen bei 1.1 % versus 27.3 % in der Risikokohorte.

**Tab. 6: Eigenschaften der Kohorten**

<b><u>Eigenschaft</u></b>	<b><u>Screeningkohorte</u></b> n = 190	<b><u>Hochrisikokohorte</u></b> n = 43
<b>Rekrutierungsort</b>	Thessaloniki, Griechenland	Berlin, Deutschland
<b>Alter (Jahre)</b>		
Durchschnitt, Standardabweichung	42.77, 7.64	35.67, 6.49
Median, Range	43, 28–60	35, 26–54
<b>hrHPV+(positiver PCR-Test)</b>		
Screen+ (alle folgenden 12 hrHPV-Typen)	32 (16.84 %)	31 (72.09 %)
hrHPV 16/18/45+	15 (7.89 %)	20 (4.65 %)
hrHPV 39/51/56/59+	17 (8.95 %)	10 (23.26 %)
hrHPV 16/31/33/35/52/58+	20 (10.53 %)	23 (53.49 %)
<b>Dysplasiestadium</b>		
ASSISTS. I. = 0	182 (95.8 %)	14 (32.6 %)
ASSIST S. I. = 1	6 (3.2 %)	17 (39.5 %)
ASSIST S. I. = 2	2 (1.1 %)	12 (27.9 %)
ASSIST S. I. = 3	0 (0 %)	0 (0 %)

## 3.2 Biosynex<sup>®</sup> Rapid Strip Test

### 3.2.1 Experiment an CxCa-Zelllinien

Vor der Anwendung an klinischen Probenführten wir ein zweimaliges Positiv- und Negativkontrollexperiment bei gezüchteten Zelllinien durch (Karzinomzellen mit hrHPV 16+, hrHPV 18+ und hrHPV 45+ sowie hrHPV-negative Zelllinien). In einem Testdurchgang wurden  $10^5$  Zellen verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 dargestellt. Alle drei hrHPV-positiven CxCa-Zellreihen produzierten positive Ergebnisse im Streifentest. Die hrHPV-negative Zelllinie ergab ein negatives Ergebnis.

**Tab. 7: Ergebnisse des Streifentests auf HeLa-, CaSki-, MS-751- und C33A-Zelllinien**

Zellen	HPV-Status	Zellzahl	Farbintensität E7 Linie	Ergebnis
HeLa	HPV 18+	$10^5$ /Test	8	Pos
HeLa	HPV 18+	$10^5$ /Test	7	Pos
CaSki	HPV 16+	$10^5$ /Test	6	Pos
CaSki	HPV 16+	$10^5$ /Test	5	Pos
MS-751	HPV 45+	$10^5$ /Test	6	Pos
MS-751	HPV 45+	$10^5$ /Test	6	Pos
C33A	HPV -	$10^5$ /Test	1	Neg
C33A	HPV -	$10^5$ /Test	1	Neg

### 3.2.2 Sensitivität und Spezifität des Biosynex<sup>®</sup> Rapid Strip E7 16/18/45

Die Sensitivitäten und Spezifitäten des Streifentests für die jeweiligen Probengruppen zur Erfassung von ASSIST S. I. 2+ bei ‚hrHPV 16/18/45+‘-Patientinnen sind in Tab. 8 dargestellt.

#### *Biosynex<sup>®</sup>-E7-Streifentest an Arztsamples der Hochrisikokohorte*

Von den insgesamt 42 Arztsamples der Hochrisikokohorte hatten 23 Proben einen positiven ‚hrHPV 16/18/45‘-Status. Davon wiesen neun dieser 23 Patientinnen klinisch einen ASSIST S. I. 2+ auf. Nur zwei der neun (ASSIST S. I. 2+ Sensitivität 22 %) Arztsamples zeigten einen positiven E7-Status im Streifentest. Zudem wurden vier weitere Arztsamples positiv auf das E7-Onkoprotein getestet; zwei Patientinnen ohne klinisch nachweisbare Dysplasie (von acht) und zwei Patientinnen mit einem diagnostizierten ASSIST S. I. 1 (von sechs).

### ***Biosynex<sup>®</sup>-E7-Streifentest an Selsamples der Hochrisikokohorte***

Von den 42 Patientinnen der Hochrisikokohorte benutzten 23 Frauen die Evalyn<sup>®</sup> Brush und 19 Frauen den Delphi<sup>®</sup> Screener zur Probenentnahme.

Von den 23 Frauen, die eine Evalyn<sup>®</sup> Brush zur Probengewinnung verwendet hatten, hatten 15 Selsamples einen positiven, hrHPV 16/18/45'-Status. Vier dieser 15 Patientinnen wiesen klinisch einen ASSIST S. I. 2+ auf. Keine dieser Patientinnen wurde positiv auf das E7-Onkoprotein im Streifentest getestet (ASSIST S. I. 2+ Sensitivität 0 %).

Von den 19 Frauen, die einen Delphi<sup>®</sup> Screener zur Probengewinnung verwendet hatten, hatten elf Selsamples einen positiven, hrHPV 16/18/45'-Status. Vier dieser elf Patientinnen wiesen klinisch einen ASSIST S. I. 2+ auf. Zwei dieser vier Patientinnen zeigten ein positives Streifentestergebnis (ASSIST S. I. 2+ Sensitivität 50 %).

### ***Biosynex<sup>®</sup>-E7-Streifentest an Arztsamples der Screeningkohorte***

Von den insgesamt 190 Patientinnen der Screeningkohorte zeigten 15 Arztsamples einen positiven, hrHPV 16/18/45'-Status. Bei nur einer dieser 15 Patientinnen wurde ein ASSIST S. I. 2 diagnostiziert. Diese fiel negativ im Streifentest aus (ASSIST S. I. 2+ Sensitivität 0 %, bei sehr breitem 95%-Konfidenzintervall). Eine Patientin zeigte einen ASSIST S. I. 1, die ebenfalls negativ auf E7 getestet wurde.

**Biosynex®-E7-Streifentest an Selsamples der Screeningkohorte**

Alle 190 Frauen der Screeningkohorte verwendeten die Evalyn® Brush zur Probengewinnung. In 25 Selsamples dieser Frauen wurde hrHPV 16/18/45 in der PCR/Genotypisierung nachgewiesen.

Analog zu den Ergebnissen der Arztsamples derselben Kohorte konnte der Streifentest kein E7 bei der einzigen kranken Patientin dieser Kohorte nachweisen (ASSIST S. I. 2+ Sensitivität 0 %, bei sehr breitem 95%-Konfidenzintervall).

**Tab. 8: Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse des Biosynex® E7 Rapid Strip zur Erfassung von ASSIST S. I. 2+ bei hrHPV 16/18/45 DNA+**

Samplingmethode	n	Sensitivität			Spezifität		
		A	%	95%-K.I.	A*	%	95%-K.I.
<i>Hochrisikokohorte</i> <i>n = 42*</i>							
Evalyn® Brush	15	0/4	0.00	0.00–60.24	10/11	90.91	58.72–99.77
Delphi® Screener	11	2/4	50.00	6.76–93.24	6/7	85.71	42.13–99.64
Arztsamples	23	2/9	22.22	2.81–60.01	10/14	71.43	41.90–91.61
<i>Screeningkohorte</i> <i>n = 190</i>							
Evalyn® Brush	25	0/1	0.00	0.00–97.50	13/14	92.86	66.13–99.82
Arztsamples	15	0/1	0.00	0.00–97.50	19/24	79.17	57.85–92.87

\* 23 Frauen verwendeten die Evalyn® Brush und 19 Frauen den Delphi® Screener

n = Anzahl an ,hrHPV 16/18/45 +‘-Frauen

A =  $\Sigma$  positiv-getestete ASSIST S.I. 2+ Proben / ( $\Sigma$  ASSIST S.I. 2+ Proben)

A\* =  $\Sigma$  negativ-getestete Proben / ( $\Sigma$  ASSIST S.I. <2 Proben)

### 3.2.3 Konkordanz der Streifentestergebnisse zwischen Selfsample und Arzt sample

In diesem Abschnitt untersuchen wir die Übereinstimmung der Streifentestergebnisse zwischen Selfsample und Arzt sample derselben Patientinnen. Diese war schwach für beide Arten der Selfsampling-Methoden (Evalyn<sup>®</sup> Brush und Delphi<sup>®</sup> Screener), unabhängig von der Kohorte.

**Tab. 9: Konkordanzanalyse der Ergebnisse des Biosynex<sup>®</sup> E7 Rapid Strip zwischen Selfsample und Arzt sample**

Selfsampler	Übereinstimmung		Cohens-Kappa		
	%	A	Wert	95%-K.I.	Konkordanz
<i>Screeningkohorte</i>					
Evalyn <sup>®</sup> Brush	72.58	135/186	0.01	-0.10 bis 0.12	schwach
<i>Hochrisikokohorte</i>					
Evalyn <sup>®</sup> Brush	58.82	10/17	-0.11	-0.31 bis 0.09	schwächer als Zufall
Delphi <sup>®</sup> Screener	64.29	9/14	0.10	-0.36 bis 0.57	schwach

A = Anzahl an übereinstimmenden Ergebnissen /  $\Sigma$  Ergebnisse

### 3.3 Mikrogen<sup>®</sup> E7 ELISA Test

#### 3.3.1 Experiment an CxCa-Zelllinien

Dader Mikrogen<sup>®</sup> E7 ELISA Test extern durchgeführt wurde, ist ein Positiv- und Negativkontroll experiment vor der Testung an klinischen Proben analog zum Streifentest nicht erfolgt. Allerdings wurden die Ergebnisse des Tests an CxCa-Zellen (HeLa, CaSki, SiHa und MS751) im Rahmen seiner Entwicklung publiziert [84].

#### 3.3.2 Sensitivität und Spezifität des Mikrogen<sup>®</sup> recomWell E7 ELISA (Selfsamples)

Wir konnten die ,Mikrogen<sup>®</sup> ELISA-Ergebnisse unserer Selfsamples nicht auswerten, da die ELISA-Ergebnisse der meisten Selfsamples (217 von 232; 93.5 %) einen Keratin-Wert von unter 0.1 OD aufwiesen. Dies bedeutet, dass die Selfsamples zu wenig Zervixzellmaterial beinhalteten, um ein valides E7-ELISA-Ergebnis zu produzieren.

### 3.3.3 Sensitivität und Spezifität des Mikrogen<sup>®</sup> *recomWell E7 ELISA* (Arztsamples)

Der Mikrogen<sup>®</sup> *recomWell E7 ELISA* besteht aus fünf Testsystemen, die das E7-Onkoprotein von vier verschiedenen hrHPV-Typ-Kombinationen erfassen. Die vollständige Liste zu der Sensitivität und Spezifität der jeweiligen Testsysteme zur Erfassung von ASSIST S. I. 2+ für alle Probengruppen und Testsysteme zeigt Tab. 10. Im Folgenden werden die wichtigsten Inhalte dieser Tabelle vorgestellt:

#### *recomWell 16/18/45 KJ<sub>low</sub> und KJ<sub>high</sub>*

Von den insgesamt 190 Arztsamples der Screeningkohorte zeigten 15 Proben einen positiven ‚hrHPV 16/18/45‘-Status. Davon wurde eine Patientin mit einem ASSIST S. I. 2+ diagnostiziert. Ihre Probe zeigte sich positiv im *recomWell 16/18/45 KJ<sub>high</sub>*, aber negativ im *recomWell 16/18/45 KJ<sub>low</sub>* (100 % und 0 % ASSIST S. I. 2+ Sensitivität, bei sehr breitem 95%-Konfidenzintervall). Die ASSIST S. I. 2+ Spezifität für die zwei Testsysteme lag bei 71.43 % beziehungsweise 42.86 %.

Von den insgesamt 42 Arztsamples der Hochrisikokohorte waren nur die Ergebnisse von 34 Proben verfügbar. 8 Proben sind für diese Untersuchung verloren gegangen. 20 Proben zeigten einen positiven ‚hrHPV 16/18/45‘-Status. Davon wurden sieben Patientinnen mit einem ASSIST S. I. 2+ diagnostiziert. Alle Proben (7/7) zeigten sich positiv im *recomWell 16/18/45 KJ<sub>high</sub>* und *recomWell 16/18/45 KJ<sub>low</sub>* (100 % ASSIST S. I. 2+ Sensitivität für beide Testsysteme). Die ASSIST S. I. 2+ Spezifität für die zwei Testsysteme lag bei 61.54 % beziehungsweise 53.85 %.

#### *recomWell 39/51/56/59*

Von den insgesamt 190 Arztsamples der Screeningkohorte zeigten 17 Proben einen positiven ‚hrHPV 39/51/56/59‘-Status. Davon wurde eine Patientin mit einem ASSIST S. I. 2+ diagnostiziert. Diese Probe zeigte sich negativ im *recomWell 39/51/56/59* (0 % ASSIST S. I. 2+ Sensitivität, bei sehr breitem 95%-Konfidenzintervall). Die ASSIST S. I. 2+ Spezifität für dieses Testsystem lag bei 87.50 %.

Von den insgesamt 42 Arztsamples der Hochrisikokohorte waren nur die Ergebnisse von 34 Proben verfügbar. Davon zeigten zehn Proben einen positiven ‚hrHPV 39/51/56/59‘-Status. Eine Patientin wurde mit einem ASSIST S. I. 2+ diagnostiziert. Diese Probe zeigte sich positiv im *recomWell 39/51/56/59* (100 % ASSIST S. I. 2+ Sensitivität, bei sehr breitem 95%-Konfidenzintervall). Die ASSIST S. I. 2+ Spezifität für dieses Testsystem lag bei 44.44 %.



recomWell 16/31/33/35/52/58

Von den insgesamt 190 Arztsamples der Screeningkohorte zeigten 20 Proben einen positiven ‚hrHPV 16/31/33/35/52/58‘-Status. Davon wurde eine Patientin mit einem ASSIST S. I. 2 diagnostiziert. Diese Probe zeigte sich positiv im *recomWell 16/31/33/35/52/58* (100 % ASSIST S. I. 2+ Sensitivität, bei sehr breitem 95%-Konfidenzintervall). Die ASSIST S. I. 2+ Spezifität für dieses Testsystem lag bei 84.21 %.

Von den insgesamt 42 Arztsamples der Hochrisikokohorte waren nur die Ergebnisse von 35 Proben verfügbar. Davon zeigten 23 Proben einen positiven ‚hrHPV 39/51/56/59‘-Status. Neun dieser Patientinnen wurden mit einem ASSIST S. I. 2+ diagnostiziert. Sechs von neun Proben zeigten sich positiv im *recomWell 39/51/56/59*. (66.67 % ASSIST S. I. 2+ Sensitivität). Die ASSIST S. I. 2+ Spezifität für dieses Testsystem lag bei 64.29 %.

recomWell-Screen

Von den insgesamt 190 Arztsamples der Hochrisikokohorte zeigten 32 Proben einen positiven ‚hrHPV 16/18/45/39/51/56/59/31/33/35/52/58‘-Status. Zwei dieser Patientinnen wurden mit einem ASSIST S. I. 2+ diagnostiziert. Beide Proben zeigten sich positiv im *recomWell-Screen* (100 % ASSIST S. I. 2+ Sensitivität, bei sehr breitem 95%-Konfidenzintervall). Die ASSIST S. I. 2+ Spezifität für dieses Testsystem lag bei 66.67 %. Einen negativen ‚hrHPV 16/18/45/39/51/56/59/31/33/35/52/58‘-Status zeigten 158 der 190 Screeningpatientinnen.

Von den insgesamt 42 Arztsamples der Hochrisikokohorte waren nur die Ergebnisse von 34 Proben verfügbar. Davon zeigten 31 Proben einen positiven ‚hrHPV 16/18/45/39/51/56/59/31/33/35/52/58‘-Status. Neun dieser Patientinnen wurden mit einem ASSIST S. I. 2+ diagnostiziert. Fünf Proben zeigten sich positiv im *recomWell-Screen* (55.56 % ASSIST S. I. 2+ Sensitivität). Die ASSIST S. I. 2+ Spezifität für dieses Testsystem lag bei 45.45 %.

**Tab. 10: Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse des Mikrogen® E7 ELISA zur Erfassung von ASSIST 2+ für alle Arzt samples**

		ASSIST S. I. 2+					
		Sensitivität			Spezifität		
ELISA Testsystem	n	A	%	95%-K.I.	A*	%	95%-K.I.
<i>Screeningkohorte</i>							
<i>n = 190</i>							
<i>recomWell</i> 16/18/45 KJ <sub>high</sub>	15	1/1	100.00	2.50–100.00	10/14	71.43	41.90–91.61
<i>recomWell</i> 39/51/56/59	17	0/1	0.00	0.00–97.50	14/16	87.50	61.65–98.45
<i>recomWell</i> 16/31/33/35/52/58	20	1/1	100.00	2.50–100.00	16/19	84.21	60.42–96.62
<i>recomWell Screen</i>	32	2/2	100.00	15.81–100.00	20/30	66.67	47.19–82.71
<i>recomWell</i> 16/18/45 KJ <sub>low</sub>	15	0/1	0.00	0.00–97.50	6/14	42.86	17.66–71.14
<i>Hochrisikokohorte</i>							
<i>n=34</i>							
<i>recomWell</i> 16/18/45 KJ <sub>high</sub>	20	7/7	100.00	59.04–100.00	8/13	61.54	31.58–86.14
<i>recomWell</i> 39/51/56/59	10	1/1	100.00	2.50–100.00	4/9	44.44	13.70–78.80
<i>recomWell</i> 16/31/33/35/52/58	23	6/9	66.67	29.9–92.51	9/14	64.29	35.14–87.24
<i>recomWell-Screen</i>	31	5/9	55.56	21.20–86.30	10/22	45.45	24.39–67.79
<i>recomWell</i> 16/18/45 KJ <sub>low</sub>	20	7/7	100.00	59.04–100.00	7/13	53.85	25.13–80.78

n =  $\Sigma$  ,hrHPV+‘-Proben (positiver DNA-Nachweis von mindestens einem hrHPV-Typ innerhalb des *recomWell*-Testspektrums)

A =  $\Sigma$  echt-positive Proben / ( $\Sigma$  echt-positive Proben +  $\Sigma$  falsch-negative Proben)

A\* =  $\Sigma$  echt-negative Proben / ( $\Sigma$  echt-negative Proben +  $\Sigma$  falsch-positive Proben)

## 4 Diskussion

Der Status quo der Diagnostik für die Erkennung von zervikalen Präkanzerosen ist verbesserungswürdig. Man erreicht zwar eine sehr hohe Sensitivität mit der PCR, jedoch ist keine Diskriminierung zwischen Infektion und Dysplasie mit dem Test möglich. Die Zytopathologie zeigt sich als diagnostisch ungenau. Die Kolposkopie und die Histopathologie erfordern die Präsenz und die Expertise eines Arztes, dies kann in Low-Resource-Settings nicht immer gewährleistet werden. Neue Ansätze, wie E7-basierte Molekularverfahren, sind Alternativen, um Patientinnen mit einer Dysplasie von denen mit einer Infektion ohne Dysplasie herauszufiltern. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die explorative Evaluation zweier E7-Nachweissysteme (Mikrogen<sup>®</sup> ELISA und Biosynex<sup>®</sup> Rapid Strip) beziehungsweise die orientierende Prüfung ihrer Sensitivität und Spezifität zur Erfassung von zervikalen Dysplasien in hrHPV+ klinischen Proben, Arztsamples und Selsamples. Zusätzlich zu einer Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse wurde der Cohens-Kappa-Wert errechnet, um die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Selsamples und der Arztsamples zu beurteilen.

### 4.1 Erkenntnisse

Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Erkenntnisse zu den beschriebenen neuen Testverfahren erläutert und die zentrale Fragestellung wird diskutiert.

#### 4.1.1 Biosynex<sup>®</sup> E7 Rapid Strip

Der Biosynex<sup>®</sup> E7 Rapid Strip war nur unzureichend in der Lage, zervikale Dysplasien in klinischen Proben effektiv zu erfassen. Die Sensitivität zur Detektion von ASSIST S. I. 2+ bei hrHPV 16/18/45+ war schwach (0-50%), unabhängig von der Art der Probengewinnung und der Kohorte. Nur 2 der 9 ASSIST S. I. 2+ Patientinnen der Hochrisikokohorte wurden positiv auf E7 im Streifentest erfasst (Sensitivität 22%). Diese Werte liegen weit unter der Sensitivitäten der schon etablierten Testverfahren [85].

Die Konkordanz der Ergebnisse zwischen Selsample und Arztsample derselben Patientin war mit  $k = -0.11 - 0.10$  unabhängig sowohl vom verwendeten Selsampler (Evalyn<sup>®</sup> Brush oder Delphi<sup>®</sup> Screener) als auch von der Kohorte schwach. Dies hat bei einer allgemein

schwachen Sensitivität wenig Relevanz, jedoch war diese Berechnung Teil der initialen Aufgabenstellung.

Es zeigte sich in unserer Studie, dass der Streifentest in vitro an  $10^5$  CxCa-Zellen ein deutlich positives Ergebnis aufweisen kann. Aus dieser Erkenntnis leitet sich die Hypothese ab, dass der Test ausschließlich in sehr hohen E7-Konzentrationen positiv ausfällt. Die E7-Konzentration könnte bei den klinischen Dysplasieproben für den Streifentest nicht ausreichend hoch sein. Dieser Ansatz sollte im Rahmen zukünftiger Studien mit selektierter Studienpopulation untersucht werden. Es wäre interessant, ein folgendes Downgrading-Experiment mit den CxCa-Zelllinien durchzuführen, um zu testen, ob auch geringere CxCa-Zellzahlen ein positives Streifentestergebnis liefern können.

#### 4.1.2 Mikrogen® E7 ELISA

Unsere Arbeit konnte zeigen, dass man zervikale Dysplasien mittels des Mikrogen® E7 ELISA erfassen kann. Allerdings trifft die Aussage ausschließlich auf Dysplasien verursacht durch hrHPV 16/18/45 und nur auf Arztsamples (nicht Selsamples) zu (siehe unten).

Weder die Selsamples der Hochrisikokohorte noch die der Screeningkohorte, unabhängig von dem hrHPV-Typ, erzeugten einen Keratin-OD-Wert über der Validitätsgrenze. 93.5% wiesen einen Keratin-OD von unter 0.1 auf. Dies spricht für die Hypothese, dass Selsamples weniger Zervixzellen beinhalten als Arztsamples, da ein Arzt unter Sicht mit einem gezielten Abstrich mehr Zervixzellen erfassen kann als per ‚blindem‘ Selsampling [86]. Es lässt sich annehmen, dass das Selsampling allgemein mit dem verwendeten Protokoll des Mikrogen® E7 ELISA nicht vereinbar ist. Allerdings wurde eine Probe für fünf *recomWells* aufgeteilt. Es wäre wichtig, die Anwendung eines vollständigen Selsamples an einzelnen *recomWells* in Folgestudien zu untersuchen. Damit wäre die Materialmenge, die eingesetzt wird höher und könnte eventuell ausreichen.

Die Erkenntnisse zu den Ergebnissen der jeweiligen *recomWell*-Testsysteme anhand der Arztsamples werden im Folgenden diskutiert:

Die Ergebnisse des *recomWell* 16/18/45  $KJ_{high}$  in der Hochrisikokohorte zeigen, dass man mit einer hohen Sensitivität ASSIST S. I. 2+ Dysplasien, verursacht durch die drei häufigsten hrHPV-Typen (16/18/45) erfassen kann (100 % Sensitivität). Allerdings ist dieser errechnete Wert relativ ungenau aufgrund einer zu kleinen Fallzahl an kranken Patientinnen ( $n=7$ ), was sich

an dem breiten Konfidenzintervall erkennen lässt (59–100 %). Trotz der geringeren Konzentration an Antikörpern wurde durch das *recomWell* 16/18/45 KJ<sub>low</sub> ebenfalls alle sieben ‚hrHPV 16/18/45 ASSIST S. I. 2+‘-Fälle als E7-positiv erfasst. Die Spezifität des ‚*recomWell* 16/18/45 KJ<sub>high</sub>‘-Testsystems lag bei 71.43 % in der Screeningkohorte und bei 61.54 % in der Hochrisikokohorte. Ein ähnliches Ergebnis konnte bei den restlichen PIPAVIR-Proben in einer Publikation von 2017 gezeigt werden [87]. In dieser Arbeit wurde eine CIN II+ Sensitivität für hrHPV 16/18+ Dysplasien von 100.00 % *recomWell* 16/18/45 KJ<sub>high</sub> und von 75.00 % für das *recomWell* 16/18/45 KJ<sub>low</sub> beobachtet. Die Spezifität lag bei 49.21 % für das *recomWell* 16/18/45 KJ<sub>high</sub> und bei 71.87 % für das *recomWell* 16/18/45 KJ<sub>low</sub>. Obwohl letztere Werte auf den ersten Blick nicht bedeutend hoch erscheinen, konnte in derselben Arbeit gezeigt werden, dass die Triage mit dem E7 ELISA nach einer positiven PCR-Diagnostik im Vergleich zur Situation ohne Triage mit dem E7 ELISA eine Reduktion der Überweisungen zu Kolposkopien bewirkte, ohne dabei einen Sensitivitätsverlust zu bewirken.

Die restlichen drei *recomWell*-Testsysteme lieferten weniger aussagekräftige Ergebnisse:

Laut unserer Ergebnisse konnte der *recomWell* 16/31/33/35/52/58 in den meisten ‚ASSIST S. I. 2+‘-Fällen der Hochrisikokohorte das E7-Onkoprotein nachweisen (66.67 % ASSIST S. I. 2+ Sensitivität in der Hochrisikokohorte beziehungsweise 6/9 Fälle). Dieses Ergebnis ist jedoch mit Vorsicht zu interpretieren, da zu beachten ist, dass von den neun Frauen, die als hrHPV+ galten und einen ASSIST S. I. 2+ aufwiesen, sieben Frauen ausschließlich mit hrHPV 16 infiziert waren. Das heißt, dass sich die errechnete Sensitivität und Spezifität hauptsächlich auf hrHPV 16 bezieht und deswegen keine aussagekräftige Schlussfolgerung zur diagnostischen Genauigkeit des *recomWell* 16/31/33/35/52/58 bezüglich der anderen HPV Typen gemacht werden kann.

Das *recomWell*-Screen (beziehungsweise hrHPV 16/18/45/31/33/35/52/58/39/61/56/59) erreichte entgegen der Erwartungen eines Screeningwells die geringste diagnostische Genauigkeit aller Testsysteme (ASSIST S. I. 2+ Sensitivität 55.56%). In der Publikation von Agorastos et al. konnte dieses Testsystem immerhin eine CIN 2+ Sensitivität von 87.50 % für hrHPV 16/18+ Patientinnen und eine CIN 2+ Sensitivität von 100% für hrHPV (non-16/18)+ Patientinnen erzeugen [87]. Es ist möglich, dass ein Fehler bei der Testung unserer Proben durch Mikroorganismen entstanden ist. Es wäre angebracht, in einer Folgestudie die Testung an diesem *recomWell* zu wiederholen.

Die Ergebnisse des *recomWell* 39/51/56/59 sind vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl (n=1) kritisch zu hinterfragen. Dieser Eindruck lässt sich durch die Breite der Konfidenzintervalle untermauern. In der Publikation von Agorastos et al. wurde dieses Testsystem aufgrund einer ebenfalls zu geringen Fallzahl an hrHPV-positiven Patientinnen nicht erwähnt[87]. Um diese spezifische Fragestellung valide beantworten zu können, bedarf es weiterer Studien mit größerer Fallzahl.

## 4.2 Limitationen

Die wichtigste Limitation dieser Dissertation ist, dass trotz des großen Aufwands in der Rekrutierung von Patientinnen und in der Testung unser Datensatz aufgrund der zu kleinen Fallzahl an kranken Patientinnen eine ungenaue Auswertung mit breiten 95% Konfidenzintervallen liefert. Dies hat die Folge, dass sich nur vorsichtig Rückschlüsse aus unseren Ergebnissen ziehen lassen. Die Rekrutierung von Patientinnen, die eine Überweisung zur ‚Dysplasiesprechstunde‘ hatten und gleichzeitig bereit waren, noch vor dem Termin selbst eine Probe zu entnehmen und per Post zurückzuschicken, erwies sich als schwierig. Die Patientinnen zeigten sich zum Teil emotional belastet durch die frische Diagnose beim niedergelassenen Gynäkologen und waren oft nicht bereit, den hohen Aufwand der Teilnahme auf sich zu nehmen. Es gab keine finanziellen oder therapeutischen Vorteile, die wir den Patientinnen anbieten konnten. Wir versuchten das Rekrutierungssetting durch eingeringeres Alter als Einschlusskriterium (25 anstatt 30 Jahre) zu optimieren. Im Laufe der Rekrutierung ging die Firma Delphi<sup>®</sup> insolvent und wir mussten auf die Evalyn Brush umsteigen. Da die zwei Selsampler jedoch zwei unterschiedliche Methoden der Probengewinnung darstellen (Lavage und Bürste), führte dies zu noch kleineren Probengruppen in der Hochrisikokohorte. Letztendlich hatte dies doch keine signifikanten Konsequenzen, da der Streifenfestest offensichtlich allgemein weder bei Arztsamples noch bei Selsamples nicht funktionierte und die Selsamples (Lavage oder Bürste) für den ELISA nicht genügend Zervixzellen beinhalten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Exploration der Fähigkeit zur Erfassung von CIN 2+/ASSIST S. I. 2+ durchzuführen. Allerdings zeigt uns die Literatur, dass die Überexprimierung von E7 und E6 mit einer erhöhten Karzinogenität beziehungsweise Krankheitsprogression einhergeht [78]. Dies können wir anhand unserer Querschnittstudie, da wir nur einen Moment beschreiben, nicht beurteilen. Deswegen wäre es ein empfehlenswerter Forschungsansatz, eine Follow-up-Untersuchung durchzuführen, um diese eventuelle Korrelation zu evaluieren.

Eine technische Limitation des Streifentests ist, dass es im Gegensatz zum ELISA keine Möglichkeit gibt, den Inhalt der Probe dahingehend zu testen, ob sich genügend Zervixzellen in der Probe befinden, um ein valides Ergebnis erzeugen zu können. Wenn anzunehmen ist, dass die Quantität und Qualität des Zellinhaltes einer Probe variieren, ist die Fortführung der Forschung und Entwicklung von Testsystemen mit zervixspezifischen Keratinen als Marker wichtig für die Qualität auch eines onkoprotein-basierten Streifentests [88].

Die Limitation des ELISA Tests zeigt sich, im Gegensatz zu einem Streifentest, vor allem in dem höheren Aufwand verbunden mit der Durchführung des Diagnostikums. Die Kosten der erforderlichen Ausrüstung und des geschulten Personals könnten sich der verbreiteten Anwendung in Regionen mit wenigen Ressourcen entgegenstellen. Andererseits sind ELISA-basierte Testverfahren in der Diagnostik in Deutschland und vielen anderen Ländern bereits etablierter Standard.

### **4.3 Aktuelle Entwicklungen und Ausblick**

Die Forschung und Entwicklung des Biosynex<sup>®</sup> E7 RapidStrip wurde inzwischen aufgrund von einer allgemein schlechten Performance eingestellt. Der Test wird zudem nicht in dem Endreport des PIPAVIR-Projekts erwähnt.

Das Potenzial eines E7- oder E6-basierten Diagnostikums wurde jedoch 2018 in einer Studie von Zhang et al. noch einmal verdeutlicht [89]. Im Laufe unserer Arbeit ist ein E6-basierter Streifentest auf den Markt gekommen. Der seit 2014 verfügbare OncoE6 Cervical Test von Arborvita<sup>®</sup> (Fremont, CA, USA), ein HPV16 und HPV18 E6 detektierender Streifentest scheint effektiv hochgradige Dysplasien und CxCa, verursacht durch hrHPV 16/18/45, erfassen zu können. Eine Publikation aus dem Jahr 2018 von Krings et al. zeigt, dass sich der Arborvita<sup>®</sup> OncoE6 Cervical Test Streifentest mit dem Selfsampling kombinieren lässt und somit eine erfolgsversprechende Alternative zur Sekundärprävention vor allem in Low-Resource-Settings darstellt [90]. Die innovativen E6- und E7-Nachweissysteme sollten an größeren und regional unterschiedlichen Populationen validiert werden. Perspektivisch könnte ein Selfsampler mit integriertem E6-/E7-basiertem Schnellstreifentest analog zu einem herkömmlichen ‚Schwangerschaftstest‘ die Diagnostik der zervikalen Dysplasie revolutionieren.

Das *recomWell* 16/18/45 KJ<sub>high</sub> der Firma Mikrogen<sup>®</sup> wurde inzwischen auf den Markt gebracht, jedoch wird ein deutlich höherer Cut-off-Wert gemäß der Herstellerangaben empfohlen. Der

empfohlene Cut-off beträgt 0,076 OD, während unser Cut-off bei -0,0205 OD lag. Dies hat zur Folge, dass sich die Sensitivität und die Spezifität stark zu unseren Werten und zu denen in der PIPAVIR-Endpublikation von Agorastos et al. unterscheiden. Ausschnitte aus der Gebrauchsanweisung zum recomWell HPV 16/18/45 sind in Abb. 7 und 8 ersichtlich.

Ergebnis	Auswertung	Interpretation
≤ 0,076 OD (nach Blank-Korrektur)	Keine Aussage möglich	Patientenprobe enthält entweder zu wenig Zellmaterial oder keine E7-Proteine der HPV HR Typen 16, 18 oder 45.
> 0,076 OD (nach Blank-Korrektur)	Positiv	Patientenprobe enthält E7-Proteine der HPV HR Typen 16 und/oder 18 und/oder 45.

Abb. 7: Cut-off-Wert gemäß Herstellerangaben des vermarkteten recomWell HPV 16/18/45

N=1574	recomWell HPV 16/18/45			
	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
*CIN2+	36,1% (22/61)	99,0% (1498/1513)	59,5% (22/37)	97,5% (1498/1537)
*CIN3+	58,3% (21/36)	99,0% (1522/1538)	56,8% (21/37)	99,0% (1522/1537)
**CIS / ***CxCa	85,7% (6/7)	98,0% (1536/1567)	16,2% (6/37)	99,9% (1536/1537)

\*CIN: cervical intraepithelial neoplasia (zervikale intraepitheliale Neoplasie)

\*\*CIS: carcinoma in situ (Karzinom in situ)

\*\*\*CxCa: cervix carcinoma (Zervixkarzinom)

Abb. 8: Sensitivitäten und Spezifitäten des vermarkteten recomWell HPV 16/18/45

Der höhere Cut-off-Wert liefert eine wesentlich höhere Spezifität, auf Kosten der Sensitivität. Das recomWell HPV 16/18/45 eignet sich mit diesem finalen Cut-off-Wert als ein besserer Bestätigungstest beziehungsweise als Zweittest nach der Genotypisierung mittels PCR. Inwiefern sich der E7 ELISA Test in Deutschland oder weltweit durchsetzen wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht klar. Wesentliche Vorteile sind jedoch die niedrigere Rate an unnötigen



Kolposkopien, die hohe Testungsrate mit bis zu 96 Proben pro Durchlauf und die Möglichkeit der Automatisierung.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Bravo, I.G., S. de Sanjose, and M. Gottschling, *The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses*. Trends Microbiol, 2010. **18**(10): p. 432-8.
2. de Villiers, E.-M., C. Fauquet, T.R. Broker, H.-U. Bernard, and H. zur Hausen, *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
3. Bernard, H.U., R.D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen, and E.M. de Villiers, *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-9.
4. *Papillomavirus Episteme - A resource of the Bioinformatics and Computational Biosciences Branch at the NIAID Office of Cyber Infrastructure and Computational Biology*. Available from: <http://pave.niaid.nih.gov/> - home.
5. Domingo, E., C.R. Parrish, and J.J. Holland, *Origin and Evolution of Viruses*. 2008: Elsevier Science.
6. Orth, G., M. Favre, and O. Croissant, *Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts*. J Virol, 1977. **24**(1): p. 108-20.
7. Coggin, J.R., zur Hausen, H., *Workshop on papillomaviruses and cancer*. Cancer Res., 1979. **39**: p. 545– 546.
8. Nishimura, A., T. Ono, A. Ishimoto, J.J. Dowhanick, M.A. Frizzell, P.M. Howley, and H. Sakai, *Mechanisms of Human Papillomavirus E2-Mediated Repression of Viral Oncogene Expression and Cervical Cancer Cell Growth Inhibition*. Journal of Virology, 2000. **74**(8): p. 3752-3760.
9. Dostatni, N., P.F. Lambert, R. Sousa, J. Ham, P.M. Howley, and M. Yaniv, *The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex*. Genes Dev, 1991. **5**(9): p. 1657-71.
10. Chen, X.S., R.L. Garcea, I. Goldberg, G. Casini, and S.C. Harrison, *Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16*. Mol Cell, 2000. **5**(3): p. 557-67.
11. Holmgren, S.C., N.A. Patterson, M.A. Ozbun, and P.F. Lambert, *The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 3938-48.
12. Bravo, I.G. and M. Félez-Sánchez, *Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine*. Evolution, Medicine, and Public Health, 2015. **2015**(1): p. 32-51.
13. Garcia-Vallve, S., A. Alonso, and I.G. Bravo, *Papillomaviruses: different genes have different histories*. Trends Microbiol, 2005. **13**(11): p. 514-21.
14. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 362-72.
15. Sherman, L., A. Jackman, H. Itzhaki, M.C. Stoppler, D. Koval, and R. Schlegel, *Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation*. Virology, 1997. **237**(2): p. 296-306.
16. Cheng, S., D.C. Schmidt-Grimminger, T. Murant, T.R. Broker, and L.T. Chow, *Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes*. Genes Dev, 1995. **9**(19): p. 2335-49.
17. Dyson, N., P.M. Howley, K. Munger, and E. Harlow, *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product*. Science, 1989. **243**(4893): p. 934-7.

18. Finzer, P., A. Aguilar-Lemarroy, and F. Rosl, *The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis*. *Cancer Lett*, 2002. **188**(1-2): p. 15-24.
19. Bertoli, C., J.M. Skotheim, and R.A.M. de Bruin, *Control of cell cycle transcription during G1 and S phases*. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2013. **14**(8): p. 518-528.
20. Yim, E.K. and J.S. Park, *The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis*. *Cancer Res Treat*, 2005. **37**(6): p. 319-24.
21. Shaw, P.H., *The role of p53 in cell cycle regulation*. *Pathol Res Pract*, 1996. **192**(7): p. 669-75.
22. Antonsson, A., O. Forslund, H. Ekberg, G. Sterner, and B.G. Hansson, *The Ubiquity and Impressive Genomic Diversity of Human Skin Papillomaviruses Suggest a Commensalic Nature of These Viruses*. *Journal of Virology*, 2000. **74**(24): p. 11636-11641.
23. Ma, Y., R. Madupu, U. Karaoz, C.W. Nossa, L. Yang, S. Yooseph, P.S. Yachinski, E.L. Brodie, K.E. Nelson, and Z. Pei, *Human Papillomavirus Community in Healthy Persons, Defined by Metagenomics Analysis of Human Microbiome Project Shotgun Sequencing Data Sets*. *Journal of Virology*, 2014. **88**(9): p. 4786-4797.
24. Workowski, K.A. and G.A. Bolan, *Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015*. *MMWR Recomm Rep*, 2015. **64**(Rr-03): p. 1-137.
25. Manhart, L.E., K.K. Holmes, L.A. Koutsky, T.R. Wood, D.L. Kenney, Q. Feng, and N.B. Kiviat, *Human papillomavirus infection among sexually active young women in the United States: Implications for developing a vaccination strategy*. *Sex Transm Dis*, 2006. **33**(8): p. 502-8.
26. Muñoz , N., F.X. Bosch , S. de Sanjosé , R. Herrero , X. Castellsagué , K.V. Shah , P.J.F. Snijders , and C.J.L.M. Meijer *Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2003. **348**(6): p. 518-527.
27. *Human Papillomavirus and Related Diseases Report*. 2016 25.02.2016; Available from: <http://www.hpvcentre.net>.
28. Toki, T., R.J. Kurman, J.S. Park, T. Kessis, R.W. Daniel, and K.V. Shah, *Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using in situ hybridization and polymerase chain reaction*. *Int J Gynecol Pathol*, 1991. **10**(2): p. 107-25.
29. Hording, U., S. Daugaard, J. Junge, and F. Lundvall, *Human papillomaviruses and multifocal genital neoplasia*. *Int J Gynecol Pathol*, 1996. **15**(3): p. 230-4.
30. Rubin, M.A., B. Kleter, M. Zhou, G. Ayala, A.L. Cubilla, W.G. Quint, and E.C. Pirog, *Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(4): p. 1211-8.
31. De Vuyst, H., G.M. Clifford, M.C. Nascimento, M.M. Madeleine, and S. Franceschi, *Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(7): p. 1626-36.
32. Mehanna, H., T. Beech, T. Nicholson, I. El-Hariry, C. McConkey, V. Paleri, and S. Roberts, *Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region*. *Head Neck*, 2013. **35**(5): p. 747-55.
33. Majewski, S. and S. Jablonska, *Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa*. *J Am Acad Dermatol*, 1997. **36**(5 Pt 1): p. 659-85; quiz 686-8.

34. Gerein, V., E. Rastorguev, J. Gerein, W. Draf, and J. Schirren, *Incidence, age at onset, and potential reasons of malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis patients: 20 years experience*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005. **132**(3): p. 392-4.
35. Goon, P., C. Sonnex, P. Jani, M. Stanley, and H. Sudhoff, *Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2008. **265**(2): p. 147-51.
36. Ozden, B., K. Gunduz, O. Gunhan, and F.O. Ozden, *A Case Report of Focal Epithelial Hyperplasia (Heck's disease) with PCR Detection of Human Papillomavirus*. *Journal of Maxillofacial & Oral Surgery*, 2011. **10**(4): p. 357-360.
37. E Vera-Iglesias, M.G.-A., P Sánchez-Caminero, G Romero-Aguilera, and P Cortina de la Calle, *Focal Epithelial Hyperplasia*. *Actas Dermosifiliogr.*, 2007. **98**(62): p. 1-3.
38. Raniel Fernandes Peixoto, G.M.d.A., Rafaela Monteiro de Araújo, Valéria Damasceno Silvestre, Ana Myriam Costa de Medeiros, *Focal epithelial hyperplasia in a Brazilian family*. *RFO, Passo Fundo*, 2013. **18**(2): p. 197-200.
39. Doorbar, J., N. Egawa, H. Griffin, C. Kranjec, and I. Murakami, *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. *Reviews in Medical Virology*, 2015. **25**: p. 2-23.
40. McKee, P.H., J.D. Wilkinson, M.M. Black, and I.W. Whimster, *Carcinoma (epithelioma) cuniculatum: a clinico-pathological study of nineteen cases and review of the literature*. *Histopathology*, 1981. **5**(4): p. 425-436.
41. Torre, L.A., F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, *Global cancer statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(2): p. 87-108.
42. Willoughby, B.J., K. Faulkner, E.C. Stamp, and C.J. Whitaker, *A descriptive study of the decline in cervical screening coverage rates in the North East and Yorkshire and the Humber regions of the UK from 1995 to 2005*. *J Public Health (Oxf)*, 2006. **28**(4): p. 355-60.
43. Quinn, M., P. Babb, J. Jones, and E. Allen, *PapersEffect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics*. *BMJ*, 1999. **318**(7188): p. 904.
44. Li, N., S. Franceschi, R. Howell-Jones, P.J. Snijders, and G.M. Clifford, *Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(4): p. 927-35.
45. Bray, F., B. Carstensen, H. Moller, M. Zappa, M.P. Zakelj, G. Lawrence, M. Hakama, and E. Weiderpass, *Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(9): p. 2191-9.
46. Adegoke, O., S. Kulasingam, and B. Virnig, *Cervical Cancer Trends in the United States: A 35-Year Population-Based Analysis*. *Journal of Women's Health*, 2012. **21**(10): p. 1031-1037.
47. Chung, S.-H., S. Franceschi, and P.F. Lambert, *Estrogen and ERα: Culprits in Cervical Cancer? Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 2010. **21**(8): p. 504-511.
48. Albores-Saavedra, J., D. Gersell, C.B. Gilks, D.E. Henson, G. Lindberg, H. Santiago, R.E. Scully, E. Silva, L.H. Sobin, F.J. Tavassoli, W.D. Travis, and J.M. Woodruff, *Terminology of endocrine tumors of the uterine cervix: results of a workshop sponsored by the College of American Pathologists and the National Cancer Institute*. *Arch Pathol Lab Med*, 1997. **121**(1): p. 34-9.

49. Wright, J.D., K. Rosenblum, P.C. Huettner, D.G. Mutch, J.S. Rader, M.A. Powell, and R.K. Gibb, *Cervical sarcomas: an analysis of incidence and outcome*. Gynecol Oncol, 2005. **99**(2): p. 348-51.
50. Villella, J.A., P.N. Bogner, S.N. Jani-Sait, A.M. Block, and S. Lele, *Rhabdomyosarcoma of the cervix in sisters with review of the literature*. Gynecol Oncol, 2005. **99**(3): p. 742-8.
51. Dursun, P., M. Gultekin, G. Bozdogan, A. Usulutun, A. Uner, N.Y. Celik, K. Yuce, and A. Ayhan, *Primary cervical lymphoma: report of two cases and review of the literature*. Gynecol Oncol, 2005. **98**(3): p. 484-9.
52. Schiffman, M., P.E. Castle, J. Jeronimo, A.C. Rodriguez, and S. Wacholder, *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
53. Burchell, A.N., R.L. Winer, S. de Sanjose, and E.L. Franco, *Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/52-61.
54. Parkin, D.M. and F. Bray, *Chapter 2: The burden of HPV-related cancers*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/11-25.
55. Stanley, M., *Immune responses to human papillomavirus*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 1**: p. S16-22.
56. Schiffman, M., R. Herrero, R. Desalle, A. Hildesheim, S. Wacholder, A.C. Rodriguez, M.C. Bratti, M.E. Sherman, J. Morales, D. Guillen, M. Alfaro, M. Hutchinson, T.C. Wright, D. Solomon, Z. Chen, J. Schussler, P.E. Castle, and R.D. Burk, *The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution*. Virology, 2005. **337**(1): p. 76-84.
57. Kinlen, L.J. and A.I. Spriggs, *Women with positive cervical smears but without surgical intervention. A follow-up study*. Lancet, 1978. **2**(8087): p. 463-5.
58. Chang, A.R., *Carcinoma in situ of the cervix and its malignant potential. A lesson from New Zealand*. Cytopathology, 1990. **1**(6): p. 321-8.
59. Papanicolaou, G., Traut, HF, *The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus*. Am J Obstet Gynecol., 1941. **41**(193).
60. Marchand, L., M. Mundt, G. Klein, and S.C. Agarwal, *Optimal collection technique and devices for a quality pap smear*. Wmj, 2005. **104**(6): p. 51-5.
61. *The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop*. Jama, 1989. **262**(7): p. 931-4.
62. Apgar, B.S., L. Zoschnick, and T.C. Wright, Jr., *The 2001 Bethesda System terminology*. Am Fam Physician, 2003. **68**(10): p. 1992-8.
63. *Münchener Nomenklatur III*.
64. Cuzick, J., A. Szarewski, D. Mesher, L. Cadman, J. Austin, K. Perryman, L. Ho, G. Terry, P. Sasieni, R. Dina, and W.P. Soutter, *Long-term follow-up of cervical abnormalities among women screened by HPV testing and cytology-Results from the Hammersmith study*. Int J Cancer, 2008. **122**(10): p. 2294-300.
65. Stoler, M.H. and M. Schiffman, *Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study*. Jama, 2001. **285**(11): p. 1500-5.
66. *Possibility of improving the inspection of the Vulva, vagina and cervix*. Munch Med Weekly Magazine, 1925. **17**(1733).
67. Cantor, S.B., M. Cardenas-Turanzas, D.D. Cox, E.N. Atkinson, G.M. Noguerras-Gonzalez, J.R. Beck, M. Follen, and J.L. Benedet, *Accuracy of colposcopy in the diagnostic setting compared with the screening setting*. Obstet Gynecol, 2008. **111**(1): p. 7-14.

68. ACOG Practice Bulletin number 66, September 2005. *Management of abnormal cervical cytology and histology*. Obstet Gynecol, 2005. **106**(3): p. 645-64.
69. Hopman, E.H., F.J. Voorhorst, P. Kenemans, C.J. Meyer, and T.J. Helmerhorst, *Observer agreement on interpreting colposcopic images of CIN*. Gynecol Oncol, 1995. **58**(2): p. 206-9.
70. Ferris, D.G. and M. Litaker, *Interobserver agreement for colposcopy quality control using digitized colposcopic images during the ALTS trial*. J Low Genit Tract Dis, 2005. **9**(1): p. 29-35.
71. Agorastos, T., V. Koutkias, M. Falelakis, I. Lekka, T. Mikos, A. Delopoulos, P.A. Mitkas, A. Tantsis, S. Weyers, P. Coorevits, A.M. Kaufmann, R. Kurzeja, and N. Maglaveras, *Semantic Integration of Cervical Cancer Data Repositories to Facilitate Multicenter Association Studies: The ASSIST Approach*. Cancer Informatics, 2009. **8**: p. 31-44.
72. Ogilvie, G.S., M. Krajden, D.J. van Niekerk, R.E. Martin, T.G. Ehlen, K. Ceballos, L.W. Smith, L. Kan, D.A. Cook, S. Peacock, G.C. Stuart, E.L. Franco, and A.J. Coldman, *Primary cervical cancer screening with HPV testing compared with liquid-based cytology: results of round 1 of a randomised controlled trial -- the HPV FOCAL Study*. Br J Cancer, 2012. **107**(12): p. 1917-24.
73. Mayrand, M.H., E. Duarte-Franco, I. Rodrigues, S.D. Walter, J. Hanley, A. Ferenczy, S. Ratnam, F. Coutlee, and E.L. Franco, *Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer*. N Engl J Med, 2007. **357**(16): p. 1579-88.
74. Rijkaart, D.C., J. Berkhof, L. Rozendaal, F.J. van Kemenade, N.W. Bulkman, D.A. Heideman, G.G. Kenter, J. Cuzick, P.J. Snijders, and C.J. Meijer, *Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(1): p. 78-88.
75. Ronco, G., P. Giorgi-Rossi, F. Carozzi, M. Confortini, P. Dalla Palma, A. Del Mistro, B. Ghiringhello, S. Girlando, A. Gillio-Tos, L. De Marco, C. Naldoni, P. Pierotti, R. Rizzolo, P. Schincaglia, M. Zorzi, M. Zappa, N. Segnan, and J. Cuzick, *Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2010. **11**(3): p. 249-57.
76. Schlichte, M.J. and J. Guidry, *Current Cervical Carcinoma Screening Guidelines*. J Clin Med, 2015. **4**(5): p. 918-32.
77. Arbyn, M., P.J.F. Snijders, C.J.L.M. Meijer, J. Berkhof, K. Cuschieri, B.J. Kocjan, and M. Poljak, *Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening?* Clinical Microbiology and Infection, 2015. **21**(9): p. 817-826.
78. Origoni, M., P. Cristoforoni, G. Carminati, C. Stefani, S. Costa, M.T. Sandri, L. Mariani, and M. Preti, *E6/E7 mRNA testing for human papilloma virus-induced high-grade cervical intraepithelial disease (CIN2/CIN3): a promising perspective*. ecanermedicalscience, 2015. **9**: p. 533.
79. Cattani, P., G.F. Zannoni, C. Ricci, S. D'Onghia, I.N. Trivellizzi, A. Di Franco, V.G. Vellone, M. Durante, G. Fadda, G. Scambia, G. Capelli, and R. De Vincenzo, *Clinical Performance of Human Papillomavirus E6 and E7 mRNA Testing for High-Grade Lesions of the Cervix*. Journal of Clinical Microbiology, 2009. **47**(12): p. 3895-3901.
80. *PIPAVIR Final Report Summary*. Available from: [http://cordis.europa.eu/result/rcn/176487\\_en.html](http://cordis.europa.eu/result/rcn/176487_en.html).
81. Verdoodt, F., M. Jentschke, P. Hillemanns, C.S. Racey, P.J. Snijders, and M. Arbyn, *Reaching women who do not participate in the regular cervical cancer screening*

- programme by offering self-sampling kits: a systematic review and meta-analysis of randomised trials.* Eur J Cancer, 2015. **51**(16): p. 2375-85.
82. Arbyn, M., F. Verdoodt, P.J. Snijders, V.M. Verhoef, E. Suonio, L. Dillner, S. Minozzi, C. Bellisario, R. Banzi, F.H. Zhao, P. Hillemanns, and A. Anttila, *Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis.* Lancet Oncol, 2014. **15**(2): p. 172-83.
83. Schmitt, M., I.G. Bravo, P.J. Snijders, L. Gissmann, M. Pawlita, and T. Waterboer, *Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 504-12.
84. Christina Metzger, A.P., Andreas M. Kaufmann, Theodoros Agorastos, Kimon Chatzistamatiou, Oliver Böcher, Werner Zwerschke, Haymo Pircher, Isabel Koch and Pidder Jansen-D, *A New Sandwich ELISA Test Simultaneously Detecting E7 Proteins of HPV-16,18 and 45 in Cervical Smears.* Clinical Microbiology: Open Access, 2016. **5**(5).
85. Melnikow, J., J.T. Henderson, B.U. Burda, C.A. Senger, S. Durbin, and M.A. Soulsby, *U.S. Preventive Services Task Force Evidence Syntheses, formerly Systematic Evidence Reviews, in Screening for Cervical Cancer With High-Risk Human Papillomavirus Testing: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force.* 2018, Agency for Healthcare Research and Quality (US): Rockville (MD).
86. Belinson, J.L., S. Hu, M. Niyazi, R.G. Pretorius, H. Wang, C. Wen, J.S. Smith, J. Li, F.J. Taddeo, R.J. Burchette, and Y.L. Qiao, *Prevalence of type-specific human papillomavirus in endocervical, upper and lower vaginal, perineal and vaginal self-collected specimens: Implications for vaginal self-collection.* Int J Cancer, 2010. **127**(5): p. 1151-7.
87. Agorastos, T., K. Chatzistamatiou, T. Moysiadis, A.M. Kaufmann, A. Skenderi, I. Lekka, I. Koch, E. Soutschek, O. Boecher, V. Kilintzis, S. Angelidou, E. Katsiki, I. Hagemann, E. Boschetti Gruetzmacher, A. Tsertanidou, L. Angelis, N. Maglaveras, and P. Jansen-Duerr, *Human papillomavirus E7 protein detection as a method of triage to colposcopy of HPV positive women, in comparison to genotyping and cytology. Final results of the PIPAVIR study.* Int J Cancer, 2017. **141**(3): p. 519-530.
88. McNamara<sup>1</sup>, S.A., A.M.K. , J.V. , I.D. , A.L. , K.-U.P. , K. , Chatzistamatiou<sup>4</sup>, T.A. , E.S. , and O.B.a.I.K. , *Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cytokeratins 5, 8, and 18, and its implications in cervical cancer screening standardization.* Journal of Clinical and Molecular Medicine, 2018. **1**(2): **1-2**.
89. Zhang, J.J., X.C. Cao, X.Y. Zheng, H.Y. Wang, and Y.W. Li, *Feasibility study of a human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein test for the diagnosis of cervical precancer and cancer.* J Int Med Res, 2018. **46**(3): p. 1033-42.
90. Krings, A., A.M. Duckelmann, L. Moser, J. Gollrad, M. Wiegnerinck, J. Schweizer, and A.M. Kaufmann, *Performance of OncoE6 cervical test with collection methods enabling self-sampling.* BMC Womens Health, 2018. **18**(1): p. 68.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sébastien Liung-Kin Ng Kuet Leong, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Explorative Evaluation zweier innovativer hrHPV-E7-Nachweissysteme zur Erfassung zervikaler Dysplasien in Arztsamples und Selsamples‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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



## Danksagung

Ich danke folgenden Personen , die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben:

Meinem Doktorvater, PD Dr. Andreas Kaufmann, für die Vergabe und Betreuung meiner Arbeit, aber vor allem für seine Geduld und seine immerpräsenste Hilfsbereitschaft.

Aleksandra Pesic, Ursula Schiller und Bianca Mandt, für die Einarbeitung und Hilfe im experimentellen Teil der Arbeit und die konstante nette Atmosphäre im Labor.

Brigitte und Mario Ng Kuet Leong, für die bedingungslose Liebe und Unterstützung während meines gesamten Lebens.

Zu guterletzt Maximillian Stier, für seine unerbittliche Motivation in Zeiten von Zweifel durch Aufmunterung, Beratung und dem Ausstrahlen müheloser Disziplin, die maßgeblich zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

## **Lebenslauf**

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

