

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

DISSERTATION

**Vergleich des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests mit
Zervixkarzinom-Screeningmethoden an
einer Probenauswahl der populationsbasierten MARZY-Studie**

*Comparison of the QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology Assay with
Cervical Cancer Screening Methods on a Selected Sample of the Population-Based
MARZY Study*

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

vorgelegt der medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Nicole Schäfer
aus Kronach

Datum der Promotion: 25.11.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Formelverzeichnis	VIII
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	2
1 Einleitung	3
1.1 Das Zervixkarzinom.....	3
1.1.1 Geschichte	3
1.1.2 Epidemiologie	4
1.1.3 Symptome und klinischer Verlauf.....	5
1.2 Humanes Papillomvirus.....	5
1.2.1 Aufbau und Klassifikation des humanen Papillomvirus	5
1.2.2 Pathogenese einer zervikalen HPV-Infektion	7
1.2.3 Progression einer HPV-Infektion zu Dysplasien.....	8
1.3 Prävention	11
1.3.1 Primärprävention	11
1.3.2 Sekundärprävention.....	12
1.4 Relevante Biomarker für das Zervixkarzinom und seine Vorstufen.....	17
2 Fragestellung.....	22
2.1 Forschungskontext dieser Arbeit	22
2.2 Zielsetzung	23
2.3 Hypothesen.....	23
3 Methodik und Materialien.....	24
3.1 Studienpopulation und Probenauswahl	24
3.1.1 Beschreibung der zugrundeliegenden MARZY-Studie.....	24
3.1.2 Substudie MABE (MARZY-Study Material Analysis for Biomarker Expression)	25
3.2 QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Test.....	27
3.2.1 Berücksichtigte Biomarker (inklusive HPV-Genotypen).....	27
3.2.2 Durchführung des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests.....	28
3.2.3 Verwendete Materialien und Geräte.....	31
3.2.4 Auswertungsvorgehen	33
3.2.5 Beadmix-Validierung	36
3.2.6 Chargenvalidierung	39
3.2.7 Test-Retest-Reliabilität.....	40
3.3 Statistische Auswertung.....	40
4 Ergebnisse	44
4.1 Deskriptive Statistik klinischer Daten und Baseline-Ergebnisse	44
4.1.1 Studienpopulation mit validem QG-MPH-Ergebnis im Baseline (Subpopulation 1)	44
4.1.2 Studienpopulation mit histologischem Ergebnis im Baseline (Subpopulation 2)	50
4.2 HR-HPV-Diagnostik mittels QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Test.....	53
4.3 Sensitivität, Spezifität, positive und negative Likelihood Ratio	54

4.3.1 Absolute Sensitivität, Spezifität sowie positive und negative Likelihood Ratio	55
4.3.2 Relative Sensitivität und Spezifität	62
4.4 Prognostische Aussagekraft des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests	68
4.4.1 Deskriptive Follow-up-Analyse	68
4.4.2 Prognostische Aussagekraft des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests unter Zugrundelegung von Zytologie und etablierten HPV-Tests	70
4.4.3 Anekdotische Darstellung der prognostischen Aussagekraft des QuantiGene-Molecular- Profiling-Histology-Tests in Bezug auf die Histologie anhand von Fallbeschreibungen	72
5 Diskussion	79
5.1 Hypothesenbezogene Ergebnisdiskussion	79
5.2 Literaturbezogene Ergebnisinterpretation	86
5.2.1 Vergleich mit den Ergebnissen der Entwicklungsstudie	86
5.2.2 Vergleich der Ergebnisse der Standard-Screeningmethoden in der MABE-Studie mit denen anderer internationaler Studien (inklusive MARZY-Studie)	89
5.3 Weiterführender wissenschaftlicher Kontext	91
5.4 QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Test als Screeningalternative mit inkludierter Triagierung	94
5.5 Limitationen der Arbeit	97
5.6 Schlussfolgerung und Ausblick	100
Literaturverzeichnis	101
Eidesstattliche Versicherung	111
Lebenslauf	112
Danksagung	113
Bescheinigung des akkreditierten Statistikers	114

Abkürzungsverzeichnis

ALDH1A1	Aldehyde Dehydrogenase 1 A1	LSIL	Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion
ALTS	ASCUS/LSIL Triage Study for Cervical Cancer	MABE	MARZY Study Material Analysis for Biomarker Expression
AP-1	Activator Protein 1	MCM	Minichromosome Maintenance
ASC-US	Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance	MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
bDNA	Branched DNA	MMP7	Matrix-Metalloproteinase 7
BL	Baseline	mRNA	Messenger RNA
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	NILM	Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy
CDKI	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor	NK	Negativkontrolle
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia	OCT4	Octamer-Binding Transcription Factor 4
CxCa	Cervical Cancer	ORF	Open Reading Frame
DNA	Desoxyribonucleic Acid	p16	p16 ^{INK4a} /CDKN2A
E	Early Gene	PC	Proprotein-Convertase
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
E6-AP	E6-Associated Protein	PCR	Polymerase Chain Reaction (hier: GP 5+/6+ RLB PCR)
FU	Follow-up	PK	Positivkontrolle
G-BA	Gemeinsamer Bundesausschuss	pRb	Retinoblastom-Protein
HC2	Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk HPV-DNA-Test	QG-MPH	QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology
hHR	High HR-HPV	qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR
HPV	Humanes Papillomvirus	RNA	Ribonucleic Acid
HR-HPV	High-Risk-HPV	ROC	Receiver Operating Characteristic
HSIL	High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion	RS	Risikoscore
HSPG	Heparansulfat Proteoglycan	SAPE	Streptavidin-konjugiertes Phycoerythrin
hURR	Humane Referenz-RNA	Sens.	Sensitivität
IFCPC	International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy	SCJ	Squamocolumnar Junction
KI	Konfidenzintervall	Spez.	Spezifität
KoKoZyt	Koordinations-Konferenz-Zytologie	SOX2	Sex Determining Region Y-Box 2
KRT17	Keratin 17	STI	Sexually Transmitted Infection
KRT7	Keratin 7	STIKO	Ständige Impfkommission
L	Late Gene	TERT	Telomerase-Reverse Transkriptase
LAST	Lower Anogenital Squamous Terminology	TOPO2 α	Topoisomerase 2 α
LBC	Liquid-Based Cytology	TZ	Transformationszone
LCR	Long Control Region	UBC	Ubiquitin C
LEEP	Loop Electrosurgical Excision Procedure	URR	Upstream Regulatory Region
LR	Likelihood Ratio	VLP	Virus-Like Particle
LR-HPV	Low-Risk-HPV	WHO	World Health Organization
		xMAP®	Multi-Analyte Profiling Beads

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweiter Vergleich der geschätzten altersstandardisierten Inzidenzen des Zervixkarzinoms pro 100.000 Frauen im Jahr 2020.	4
Abbildung 2: Altersstandardisierte Mortalitätsrate von Frauen mit Zervixkarzinom in Deutschland im zeitlichen Verlauf.	4
Abbildung 3: A) Das HPV 16 Genom in schematischer Darstellung. B) Die Eigenschaften und Funktionen der Open Reading Frames des HPV.	6
Abbildung 4: Möglicher Verlauf einer HPV-Infektion und ihrer Stadien an der zervikalen Transformationszone.	8
Abbildung 5: Interaktionen der HPV-Onkoproteine E7 und E6 mit zellulären Regulatoren und deren Effekte bei der Entstehung des Zervixkarzinoms.	10
Abbildung 6: Das humane Papillomvirus (HPV) 16 Genom mit den relevanten gesplicten mRNA-Sequenzen.	18
Abbildung 7: A) Darstellung der zervikalen Junctionszone. B) KRT7- und MMP7-Färbungen der zervikalen Junctionszone in den verschiedenen Dysplasiestadien.	19
Abbildung 8: Übersicht des Ein- und Ausschlussverfahrens für die Querschnittsanalysen der Baseline-Proben.	25
Abbildung 9: Übersicht des Ein- und Ausschlussverfahrens für die longitudinalen Analysen der Proben.	26
Abbildung 10: Arbeitsschritte der Zellyse und des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests.	31
Abbildung 11: Auswertung und Vergleich der Messungen mit dem alten und dem neuen Beadmix anhand der Risikoscoreberechnungen bei sechs verschiedenen Patientinnen pro histologischer Gruppe (Normal, CIN1, CIN2, CIN3 und CxCa). A) RS CIN2+. B) RS CIN3+. C) RS CxCa.	39
Abbildung 12: Darstellung der rohen Sensitivitäten und Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN2+ in Subpopulation 2.	58
Abbildung 13: Darstellung der rohen Sensitivitäten und Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN3+ in Subpopulation 2.	58
Abbildung 14: Darstellung der adjustierten Sensitivitäten und Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN2+ in Subpopulation 2.	60
Abbildung 15: Darstellung der adjustierten Sensitivitäten und Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN3+ in Subpopulation 2.	60
Abbildung 16: Relative Sensitivitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN2+ in Subpopulation 2.	63
Abbildung 17: Relative Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN2+ in Subpopulation 2.	64
Abbildung 18: Relative Sensitivitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN3+ in Subpopulation 2.	65
Abbildung 19: Relative Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN3+ in Subpopulation 2.	65
Abbildung 20: Relative Sensitivitäten mit Konfidenzintervallen unter Verwendung des Cutoffs PAP IIID für den histologischen Endpunkte CIN2+ in Subpopulation 2.	66
Abbildung 21: Relative Spezifitäten mit Konfidenzintervallen unter Verwendung des Cutoffs PAP IIID für den histologischen Endpunkte CIN2+ in Subpopulation 2.	67
Abbildung 22: Relative Sensitivitäten mit Konfidenzintervallen unter Verwendung des Cutoffs PAP IIID für den histologischen Endpunkte CIN3+ in Subpopulation 2.	67

Abbildung 23: Relative Spezifitäten mit Konfidenzintervallen unter Verwendung des Cutoffs PAP IIID für den histologischen Endpunkte CIN3+ in Subpopulation 2.....	68
Abbildung 24: Darstellung der Biomarkerexpression bei der Baseline-Untersuchung für eine Auswahl an Fallbeschreibungen.....	78
Abbildung 25: Vergleich der Arbeitsschritte der qRT-PCR mit denen des QG-MPH.	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Münchner Nomenklatur III und II im Vergleich mit dem Bethesda-System.	14
Tabelle 2: Liste häufig verwendeter HPV-Tests, die die festgelegten Kriterien der deutschen Leitlinie AWMF erfüllen.	16
Tabelle 3: Vergleich der histologischen Einteilungssysteme von Präkanzerosen, LAST und CIN.	17
Tabelle 4: Einteilung der im QG-MPH-Test dieser Arbeit berücksichtigten Biomarker in ihre jeweilige funktionelle Gruppe.	28
Tabelle 5: Zusammensetzung des Diluted Working Lysis Mixture.	28
Tabelle 6: Zusammensetzung des Working Bead Mix.	29
Tabelle 7: Zusammensetzung des Waschpuffers für eine 96-Well-Platte.	29
Tabelle 8: Verwendete Reagenzien während der Lyse und des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests.	32
Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte.	32
Tabelle 10: Verwendete HR-HPV-Cutoffs mit Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu den Ergebnissen des Multiplex Genotypings.	33
Tabelle 11: Variationskoeffizienten der relativierten Biomarkermessergebnisse zwischen altem und neuem Beadmix. A) HPV16 E1 ⁺ E4. B) TERT.	37
Tabelle 12: Vergleich der QG-MPH Dysplasie-Diagnosen der 39- und 40-Plex Charge.	40
Tabelle 13: Bewertung der Ergebnisse der Likelihood Ratio (LR).	43
Tabelle 14: Beschreibung der Subpopulation 1 (n = 524) anhand klinischer Daten und der Baseline-Ergebnisse der MARZY-Studie.	46
Tabelle 15: Vergleich der HR-HPV-Ergebnisse der PCR der MARZY-Studie mit denen der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik für die Gesamtpositivität, die Risikogruppen (High-HR, Medium-HR und Potential-HR) und die einzelnen Genotypen in Subpopulation 1.	47
Tabelle 16: Vergleich der Ergebnisse der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik mit denen der zytologischen Untersuchungen der MARZY-Studie in Subpopulation 1.	49
Tabelle 17: Vergleich der HR-HPV-Ergebnisse der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik und der der PCR... 49	49
Tabelle 18: Beschreibung der Subpopulation 2 (n = 61) anhand klinischer Daten und Baseline-Ergebnisse der MARZY-Studie, eingeteilt in die jeweilige histologische Gruppe (Normal, CIN1, CIN2, CIN3).	52
Tabelle 19: Vergleich der Ergebnisse der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik mit denen der histologischen Untersuchung der MARZY-Studie in Subpopulation 2.	53
Tabelle 20: Übereinstimmungsanalyse der HR-HPV-Ergebnisse der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik, der PCR und des HC2 mittels Berechnungen von Konkordanz (K) und Cohens Kappa (κ) in Subpopulation 1.	54
Tabelle 21: Rohe Sensitivitäten und Spezifitäten sowie positive und negative Likelihood Ratios für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ in Subpopulation 2.	57
Tabelle 22: Adjustierte Sensitivitäten, Spezifitäten sowie positive und negative Likelihood Ratios für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ in Subpopulation 2.	59
Tabelle 23: Rohe Sensitivitäten, Spezifitäten sowie positive und negative Likelihood Ratios unter Verwendung des Cutoffs PAP IIID für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ in Subpopulation 2.	61
Tabelle 24: Adjustierte Sensitivitäten, Spezifitäten sowie positive und negative Likelihood Ratios unter Verwendung des Cutoffs PAP IIID für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ in Subpopulation 2.	62

Tabelle 25: Anzahl der persistierenden und ausgeheilten Infektionen gemäß der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden.	70
Tabelle 26: Anzahl der Neuerkrankungen und durchgängig unauffälligen Ergebnisse gemäß der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden.	70
Tabelle 27: Gegenüberstellung der kombinierten Ergebnisse aus Zytologie und QG-MPH CIN2+-Diagnostik im Baseline mit den Follow-up-Resultaten beider Methoden.	72
Tabelle 28: Gegenüberstellung der kombinierten Ergebnisse aus HR-HPV- und QG-MPH CIN2+-Diagnostik im Baseline mit den Follow-up-Resultaten beider Methoden.	72
Tabelle 29: Fallbeschreibungen von Patientinnen mit auffälliger Histologie (CIN2+) im Baseline oder Follow-up sowie von Patientinnen mit histologischer Untersuchung zu beiden Zeitpunkten.	77
Tabelle 30: Vergleich der Sensitivitäten und Spezifitäten für den RS CIN2+, RS CIN3+ bzw. für die QG-MPH CIN2+- und QG-MPH CIN3+-Diagnostik, für den PAP und für einen etablierten HPV-Test zwischen der QG-MPH-Entwicklungs- und der MABE-Studie.....	89
Tabelle 31: Vergleich der Sensitivitäten und Spezifitäten für die Zytologie und den HC2 hinsichtlich CIN2+ in der MABE-Studie mit denen anderer internationaler Studien (inklusive MARZY-Studie).	90
Tabelle 32: Vergleich der Hands-on-Zeit des QG-MPH mit der der qRT-PCR für die Messung von fünf bzw. 40 Biomarkern.	94
Tabelle 33: Übersicht der erwarteten Kosten, Belastung und Dauer des aktuellen Screenings und der Abklärungsdagnostik im Vergleich mit denen des QG-MPH.....	96

Formelverzeichnis

Formel 1: Formel zur Relativierung der Biomarker.....	34
Formel 2: Formel zur Berechnung des Risikoscores CIN2+.....	35
Formel 3: Formel zur Berechnung des Risikoscores CIN3+.....	35
Formel 4: Formel zur Berechnung des Risikoscores CxCa.....	35
Formel 5: Formel zur Berechnung der Konkordanz (p_0) bei einer Gesamtzahl (n).....	41
Formel 6: Formel zur Berechnung von Cohens Kappa (κ) und der zufälligen Übereinstimmungen (p_e) bei einer Gesamtzahl (n).....	42
Formel 7: Formel zur Berechnung der Sensitivität.....	42
Formel 8: Formel zur Berechnung der Spezifität.....	42
Formel 9: Formel zur Berechnung der positiven Likelihood Ratio ($LR+$).....	42
Formel 10: Formel zur Berechnung der negativen Likelihood Ratio ($LR-$).....	43

Zusammenfassung

Einleitung: Das zytologische Zervixkarzinomscreening wurde im Januar 2020 in Deutschland um einen humanen Papillomvirus (HPV) Test erweitert. Dadurch wird die Sensitivität (Sens.) erhöht, die Spezifität (Spez.) aber reduziert, was zu Überdiagnostik führen kann und daher Triagierung erfordert. Diese Arbeit prüft den QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology (QG-MPH) Test an einer Subpopulation der MARZY-Screeningkohorte als Screening- und Triagemethode.

Methodik: Der QG-MPH quantifiziert onkogene mRNA von 18 High-Risk (HR) HPV-Genotypen sowie von zellulären Biomarkern aus Zervixabstrichen. Für die Methode wurden HPV-Cutoffs und Risikoscores für die Krankheitsschwellen zervikale intraepitheliale Neoplasie 2 und höher (CIN2+), CIN3+ und invasives Karzinom mit Abstrichen von Querschnitts- und Überweisungspopulationen entwickelt, welche in dieser Arbeit an einer Subpopulation (n = 524) der MARZY-Kohorte im Querschnitt evaluiert wurden. An Proben mit gesicherter Histologie (n = 61) wurden Sens. und Spez. bestimmt. Die prognostische Aussagekraft des QG-MPH wurde mittels Follow-up (FU) Analysen (n = 499) und 15 Fallbeschreibungen deskriptiv statistisch beurteilt.

Ergebnisse: Der Vergleich QG-MPH HR-HPV-Diagnostik und Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test (HC2; Qiagen, Venlo, Niederlande) bzw. GP 5+/6+ RLB PCR (PCR; In House Test; Amsterdam UMC, VUMC, Niederlande) zeigt eine Konkordanz von 87 % bzw. 85 % bei einem mittelmäßigem κ von 0,29 bzw. 0,27. Für die Detektion von CIN2+ und CIN3+ erreicht die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik eine Sens. von 56 % bzw. 67 % (adjustiert 23 % bzw. 21 %) bei einer Spez. von 87 % bzw. 85 % (adjustiert 97 %). Die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik mittels Risikoscores – die zelluläre Biomarker einschließen – verzeichnet für CIN2+ bzw. CIN3+ eine Sens. von 67 % bzw. 83 % (adjustiert 27 %) bei einer Spez. von 83 % bzw. 82 % (adjustiert 85 %).

Diskussion: Die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik zeigt sich 11–124 % spezifischer, aber 15–38 % weniger sensitiv als die DNA-basierten HPV-Tests HC2 und PCR. Im Vergleich zum PAP und zur flüssigkeitsbasierten Zytologie (LBC) ist die QG-MPH HR-HPV- und QG-MPH-Dysplasie-Diagnostik 64–205 % sensitiver bei größtenteils vergleichbarer (9 % höherer bis 11 % niedrigerer) Spez. Für den HC2, die PCR und die Cotesting-Varianten ergeben sich im Vergleich zur QG-MPH Dysplasie-Diagnostik eine 2 % höhere bis 68 % geringere Spez. bei gleicher Sens. für CIN3+ und gleicher bis 37 % höherer Sens. für CIN2+. Die deskriptiven FU-Analysen und Fallbeschreibungen legen eine Prognostik der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik nahe. Somit könnte der QG-MPH eine kosteneffiziente, nicht-invasive Screening- und Triagemethode darstellen, was jedoch in weiteren prospektiven, longitudinalen Screeningstudien validiert werden muss.

Abstract

Background: Since January 2020, the German cytological screening program for cervical cancer was amended by a Human Papillomavirus (HPV) test. This increases the sensitivity (sens.) but decreases the specificity (spec.), potentially leading to overdiagnosis, and necessitates a triage step. This study examines the QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology (QG-MPH) assay on a subsample of the MARZY screening cohort as a potential screening and triage method.

Methods: The QG-MPH quantifies oncogenic mRNA of 18 High-Risk (HR) HPV genotypes and cellular biomarkers from cervical smears. HPV cutoffs and risk scores for the disease thresholds cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and higher (CIN2+), CIN3+ and invasive carcinoma were calculated using this method in cross-sectional studies of referral-populations. In this study, these results were evaluated cross-sectionally with a subpopulation (n = 524) of the cohort study MARZY. On all samples with a valid histology result (n = 61) sens. and spec. were determined. The prognostic potential of the QG-MPH was estimated by descriptive statistics on follow-up (FU) analyses (n = 499) and 15 case reports.

Results: The comparisons of QG-MPH HR-HPV-diagnostic with Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk HPV DNA test (HC2; Qiagen, Venlo, Netherlands) and GP 5+/6+ RLB PCR (PCR; in-house test; Amsterdam UMC, VUMC, Netherlands) show a concordance of 87 % and 85 % at a fair κ of 0.29 and 0.27, respectively. For the detection of CIN2+ and CIN3+ the QG-MPH HR-HPV-diagnostic achieves a sens. of 56 % and 67 % (adjusted 23 % and 21 %) with a spec. of 87 % and 85 % (adjusted 97 %), respectively. The QG-MPH dysplasia-diagnostic using the risk scores – which include cellular biomarkers – has a sens. of 67 % and 83 % (adjusted 27 %) with a spec. of 83 % and 82 % (adjusted 85 %) for the detection of CIN2+ and CIN3+, respectively.

Discussion: The QG-MPH HR-HPV-diagnostic shows a 11–124 % higher spec., but a 15–38 % lower sens. than the DNA-based HPV tests HC2 and PCR. Compared to PAP and liquid-based cytology (LBC) the QG-MPH HR-HPV- and the QG-MPH dysplasia-diagnostic are 64–205 % more sensitive with a mostly comparable spec. (9 % higher up to 11 % less spec.). The HC2, the PCR and the different cotesting scenarios yielded a 2 % higher up to 68 % lower spec. with an equal sens. for CIN3+ and an equal or up to 37 % higher sens. for CIN2+ compared to the QG-MPH dysplasia-diagnostic. The descriptive FU analyses and case reports suggest a prognostic potential of the QG-MPH dysplasia-diagnostic. Thus, the QG-MPH may be a cost-efficient, non-invasive screening and triage method. However, validations in prospective, longitudinal screening studies are mandatory.

1 Einleitung

1.1 Das Zervixkarzinom

1.1.1 Geschichte

Seit den 1880er Jahren wird das Zervixkarzinom als eigenständige Erkrankung geführt. Der Gynäkologe Johann Veit (1852–1917) und sein Kollege, der Pathologe Carl Ruge (1846–1926), die beide u. a. auch an der Charité in Berlin tätig waren, brachten damals erstmals die Unterscheidung zwischen dem oberen Gebärmutterkrebs (Endometriumkarzinom) und dem unteren Gebärmutterkrebs, dem Krebs des Gebärmutterhalses (Zervixkarzinom), auf.¹

Als erste Früherkennungsuntersuchung für das Zervixkarzinom, welche für die Therapie einer solch malignen Erkrankung sehr bedeutend ist, entwickelte Hans Hinselmann (1884–1959), ein deutscher Gynäkologe, 1925 die Kolposkopie. Hierbei können mithilfe einer Vergrößerungsoptik (Kolposkop) Unregelmäßigkeiten der Schleimhautoberfläche von Vulva, Vagina und Portio beobachtet und beurteilt, und somit Anzeichen auf ein Zervixkarzinom bereits in einem symptomfreien Stadium erkannt werden.² Neben dieser makroskopischen Untersuchungsmethode begann George Nicholas Papanicolaou (1883–1962) in den 1920er Jahren eine mikroskopische Variante der Früherkennung zu entwickeln, die heute PAP oder konventionelle Zytologie genannt wird. Dafür entnahm er weiblichen Angestellten einer New Yorker Frauenklinik systematisch zervikale Abstriche und untersuchte diese unter dem Mikroskop auf Zellveränderungen. Es war ihm möglich, in Abstrichen tumorös und präkanzerös veränderte Zellen von normalen Zellen zu unterscheiden, sodass er ein Zervixkarzinom bereits in dessen Vorstufen ohne makroskopisch sichtbare Veränderungen identifizieren konnte. Anerkennung erlangten seine Beobachtungen aber erst später, weshalb seine Methode zur Früherkennung des Zervixkarzinoms erst in den 1950er Jahren weltweit, in Deutschland sogar erst 1972, eingeführt wurde.^{3, 4, 5}

Einen weiteren Meilenstein in der Forschung um das Zervixkarzinom lieferte Harald zur Hausen (geb. 1936) in den 1980er Jahren. Er identifizierte das humane Papillomvirus (HPV) als Ursache des Zervixkarzinoms bzw. zervikaler Dysplasien⁶ und erhielt dafür 2008 den Nobelpreis für Medizin.⁷ Nach dem heutigen Stand der Forschung sind mehr als 90 % aller Zervixkarzinome mit High-Risk-HPV (HR-HPV) assoziiert und nur wenige Fälle mit anderen Ursachen zu verzeichnen.^{8,9} Diese Erkenntnis stellt auch heute noch die Grundlage weiterer Forschungsarbeiten zu einer verbesserten Früherkennung und Primärprävention durch Impfungen dar.

1.1.2 Epidemiologie

Das Zervixkarzinom ist mit weltweit ca. 600.000 Neuerkrankungen pro Jahr aktuell die vierthäufigste Krebsart bei Frauen. Die Mehrheit der Patientinnen stammt aus Entwicklungsländern, vornehmlich aus Afrika, wie Abbildung 1 für das Jahr 2020 zeigt.¹⁰

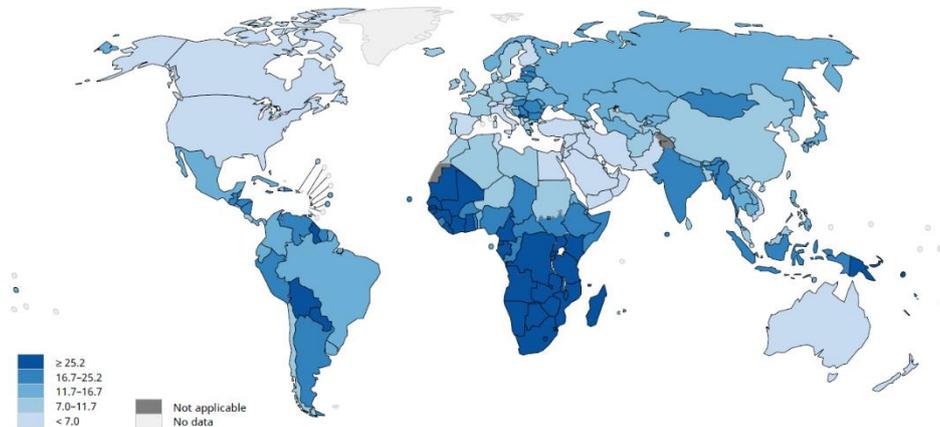


Abbildung 1: Weltweiter Vergleich der geschätzten altersstandardisierten Inzidenzen des Zervixkarzinoms pro 100.000 Frauen im Jahr 2020. [Quelle: International Agency for Research on Cancer, 2021¹⁰]

In Deutschland stellte der Gebärmutterhalskrebs im Jahr 2020 mit einer Inzidenz von 4.666 die vierzehnthäufigste Krebserkrankung bei Frauen dar.¹⁰ Aufgrund der oben genannten Forschungserkenntnisse, besonders durch die Einführung der PAP-Untersuchung, konnte die Mortalität des Zervixkarzinoms von den 1970ern bis in die 2000er in Deutschland deutlich gesenkt werden. So lag die altersstandardisierte Mortalitätsrate 1973 in Deutschland noch bei 6,71/100.000/Jahr (4.274) und fiel bis zum Jahr 2006 auf 1,79/100.000/Jahr (1.492) (Abb. 2).¹¹

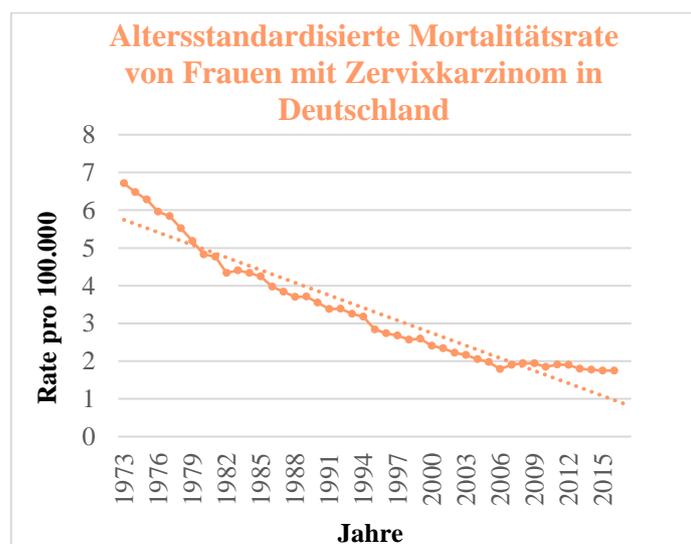


Abbildung 2: Altersstandardisierte Mortalitätsrate von Frauen mit Zervixkarzinom in Deutschland im zeitlichen Verlauf. (Jährliche Inzidenzwerte (fett), Trendlinie (dünn)) [Modifiziert nach WHO, 2019¹¹]

Doch in den letzten 10 Jahren stagnierten diese Zahlen, sodass 2020 mit einer altersstandardisierten Mortalitätsrate von 2,2/100.000/Jahr kein weiterer Rückgang zu verzeichnen war.¹⁰ Daher ist eine Verbesserung bisheriger Früherkennungsmaßnahmen dringend notwendig.

1.1.3 Symptome und klinischer Verlauf

Das Zervixkarzinom wird in eine lokal begrenzte und eine invasive Form eingeteilt. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter von Frauen mit einem bereits invasiven Zervixkarzinom in Deutschland bei 53 Jahren, wohingegen ein lokal begrenzter Tumor (intraepithelial) der Zervix meistens etwa 20 Jahre früher auftritt. Letzterer wird aufgrund seiner fehlenden Invasion ins umliegende Gewebe auch in-situ-Karzinom genannt.¹²

Sowohl die Vorstufen, sogenannte Präkanzerosen, als auch das Frühstadium dieser Erkrankung sind in den meisten Fällen symptomlos. Erste Symptome treten meist erst in fortgeschrittenen Stadien auf. Zu diesen zählen ein fleischwasserfarbener, übelriechender Fluor und vaginale Blutungen, wie z. B. Kontaktblutungen, Schmierblutungen, Metorrhagien und postmenopausale Blutungen. Selten kommt es bei weiter fortgeschrittenen invasiven Zervixkarzinomen auch zu lumbosakralen Schmerzen, Miktions- und Defäkationsbeschwerden, Lymphödemen und einer Hydronephrose.¹³ Aufgrund dieser sehr unspezifischen, spät auftretenden Symptome ist eine optimale Früherkennungsuntersuchung für einen positiven Therapieverlauf von großer Bedeutung.

1.2 Humanes Papillomvirus

1.2.1 Aufbau und Klassifikation des humanen Papillomvirus

Das von zur Hausen in den 1980er Jahren identifizierte HPV, ein unbehüllt doppelsträngiges DNA (Desoxyribonukleinsäure) Virus aus der Familie der Papillomaviridae, ist ca. 50–60 nm groß und beinhaltet ein ca. 8.000 Basenpaare großes Genom. Dieses enthält acht bis neun Leserahmen, Open Reading Frames (ORF), welche in drei Gruppen eingeteilt werden.^{14,15} Dabei sind die Aufgaben der frühexprimierten Gene, der „Early Genes“ E1, E2, E4–E7, die Virusreplikation, Regulationsprozesse und die Umprogrammierung der Wirtszelle durch Wechselwirkung mit zellulären Proteinen. Die beiden viralen spätexprimierten Gene, die „Late Genes“ L1 und L2, sind hingegen für den Aufbau des Viruskapsids zuständig. Komplementiert wird das Erbgut des Virus durch eine nicht kodierende Long Control Region (LCR), auch Upstream Regulatory Region (URR) genannt, welche die Kontrolle über die Replikation und Transkription des genetischen Materials übernimmt.^{15,16} Abbildung 3 stellt die doppelsträngige zirkuläre DNA von HPV 16 als Kreis dar und erklärt kurz die einzelnen Funktionen der Sequenzen.

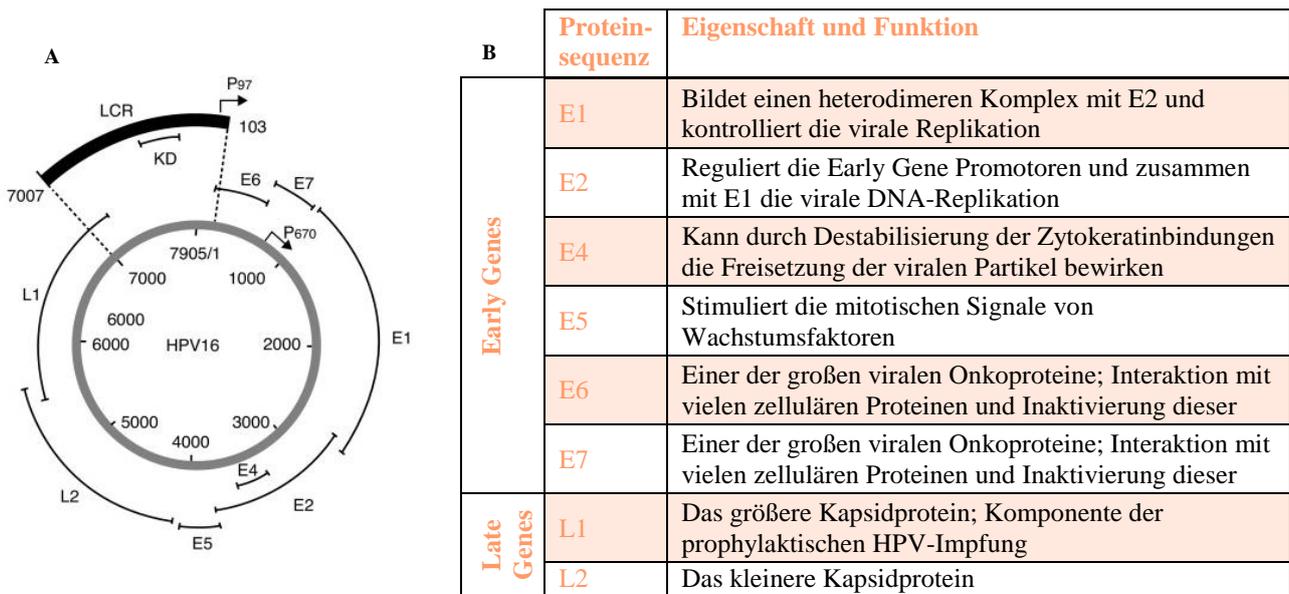


Abbildung 3: A) Das HPV 16 Genom in schematischer Darstellung. B) Die Eigenschaften und Funktionen der Open Reading Frames des HPV. (DNA = Desoxyribonucleic Acid, E = Early Gene, HPV = Humanes Papillomvirus, L = Late Gene, LCR = Long Control Region, P97 und P670 = Promotoren,) [Modifiziert nach Viariso et al., 2017¹⁷]

Verschiedene Papillomvirustypen lassen sich anhand von Strukturabweichungen der L1-Nukleotidsequenz (um mindestens 10 %) unterscheiden.^{18,19} Mit diesem Klassifikationssystem wurden bereits mehr als 200 verschiedene Papillomvirustypen identifiziert, von denen ca. 150 spezielle Unterarten des humanen Papillomvirus sind. Dabei lassen sich die unterschiedlichen human infizierenden Genotypen aufgrund von Ähnlichkeiten in der L1-Nukleotidsequenz in fünf verschiedene Genera, alpha, beta, gamma, nu und mu einteilen, wobei nur die Genotypen des Genus alpha die Schleimhaut infizieren und damit für das Zervixkarzinom verantwortlich sein können.^{14,17,19,20} Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass HPV streng speziesspezifisch ist.

Die World Health Organization (WHO) und auch die deutschen Leitlinien stufen momentan 12 bzw. 13 HPV-Genotypen als „High-Risk“ bezüglich ihres karzinogenen Potentials ein. Dazu zählen die Genotypen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und potentiell auch 68,^{16,21} wobei die Genotypen 16 und 18 für etwa 70% der Gebärmutterhalskrebsfälle ursächlich sind.^{8,22} Dabei löst Genotyp 16 überwiegend Plattenepithelkarzinome, die häufigste histologische Subgruppe des Gebärmutterhalskrebses, aus, während Genotyp 18 v. a. zu Adenokarzinomen führt.²³ Letztere machen in Deutschland etwa 20 % aller Zervixkarzinome aus.¹²

Sogenannte „Low-Risk“-HPV-Genotypen (LR-HPV), wie z. B. HPV 6 und 11, dagegen tragen nicht zur Inzidenz des Zervixkarzinoms bei,²² rufen aber häufig lästige Kondylome (Genitalwarzen) hervor, für die es eine breite Auswahl therapeutischer Optionen gibt. Diese lassen sich grob in eine topisch nicht chirurgische und eine ablativ-chirurgische Behandlung einteilen.

Eine antivirale Therapie, die sich speziell gegen HPV richtet, konnte bislang noch nicht entwickelt werden.²⁴

1.2.2 Pathogenese einer zervikalen HPV-Infektion

Eine zervikale HPV-Infektion erfolgt meist auf sexuellem Weg, sodass eine erste Infektion häufig bereits kurz nach Aufnahme erster sexueller Aktivitäten auftritt.^{25,26} Über Mikroläsionen der zervikovaginalen Mukosa gelangt das HPV an deren Basalmembran.¹⁶ Mithilfe seines L1-Proteins kann das Virus an die in dieser Membran enthaltenen Heparansulfat Proteoglykane (HSPG) binden, die so als initiale, virale Rezeptoren fungieren.^{27,28} Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung des Viruskapsids, welche wiederum mithilfe der Proprotein-Convertase (PC), Furin, und/oder PC5/6 die Spaltung des L2-Proteins bewirkt. Dies ermöglicht die Bindung des Virus an die aufgrund von Wundheilungsprozessen eingewanderten Keratinozytenstammzellen und führt zu einer Clathrin- oder Caveolin 1- und Dynamin 2-assoziierten Endozytose des Virusgenoms.²⁹⁻³¹ Danach folgt die (durch pH-Abnahme verursachte) Freisetzung des Virusgenoms und sein Transport zum Nucleus, wo es als extrachromosomal episomales Genom vorliegt.^{32,33}

Bei einer HPV-Infektion sind bis zu drei Stadien möglich. Direkt nach dem Viruseintritt und der Freisetzung des Virusgenoms folgt zunächst ein latentes Stadium ohne starke transkriptionelle Aktivität des Virus. Demzufolge treten hierbei auch keinerlei histopathologische Veränderungen des Epithels auf, sodass von einer klinisch inapparenten Infektion die Rede ist.³² Aufgrund noch nicht verstandener Bedingungen kann die Virusinfektion nun in einigen Fällen in ein permissives Stadium übergehen. Das HPV-Virusgenom besitzt keine Gene oder Enzyme zu dessen Integration in das Chromosom der Wirtszelle und auch keine, die für eine autonome Replikation notwendig wären. Eine HPV-Replikation und damit die Bildung eines HPV-Virusreservoirs in den Basalzellen ist komplett von zellulären Replikationsmechanismen abhängig.^{32,34,35} Kommt es im Verlauf zur Differenzierung der von den infizierten Basalzellen gebildeten Tochterzellen, hat das HPV mithilfe seiner Gensequenzen E6 und E7 die Möglichkeit, die Zelle am Verlassen des Zellzyklus bei der terminalen Differenzierung zu hindern und damit die Replikation weiter aufrecht zu erhalten.^{16,36} Kontrolliert werden diese beiden Early Genes E6 und E7 v. a. durch E2, das durch Autoregulationsmechanismen für die Herstellung eines Gleichgewichts zwischen Expression und Hemmung der Promotoren von E6 und E7 von großer Bedeutung ist. Die mittels des E2-Regulationsmechanismus auf einem niedrigen Niveau gehaltenen E6- und E7- Transkripte führen neben der Replikation der eigenen Virus-DNA auch zu der der Wirtszelle, was fast immer eine produktive Hyperproliferation des Gewebes und somit das Hervortreten einer HPV-

assoziierten Gewebeveränderung (Läsion, Dysplasie) zur Folge hat.^{32,37} Sobald die Wirtszelle nun einen bestimmten Grad der Differenzierung erreicht hat, fällt die Produktion der Early Genes ab, wohingegen die der Late Genes steigt.^{32,35,38} Letztere sorgen für die Synthese viraler Kapside, welche das Virusgenom verpacken und für dessen passive Freisetzung an der epithelialen Oberfläche und einer dadurch bedingten Virusverbreitung wichtig sind. Dieses Stadium wird histologisch als zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) des Grades 1 bezeichnet. Sobald allerdings die Sequenzen E6 und E7 beginnen sehr stark transkribiert zu werden und es folglich zu einer Genominstabilität der Wirtszelle kommt, muss von einem transformierenden Stadium der Infektion ausgegangen werden, welches sich als CIN des Grades 2+ präsentiert.³² Abbildung 4 veranschaulicht den möglichen Verlauf einer HPV-Infektion und ihrer Stadien. Auf das transformierende Stadium wird nachfolgend genauer eingegangen.

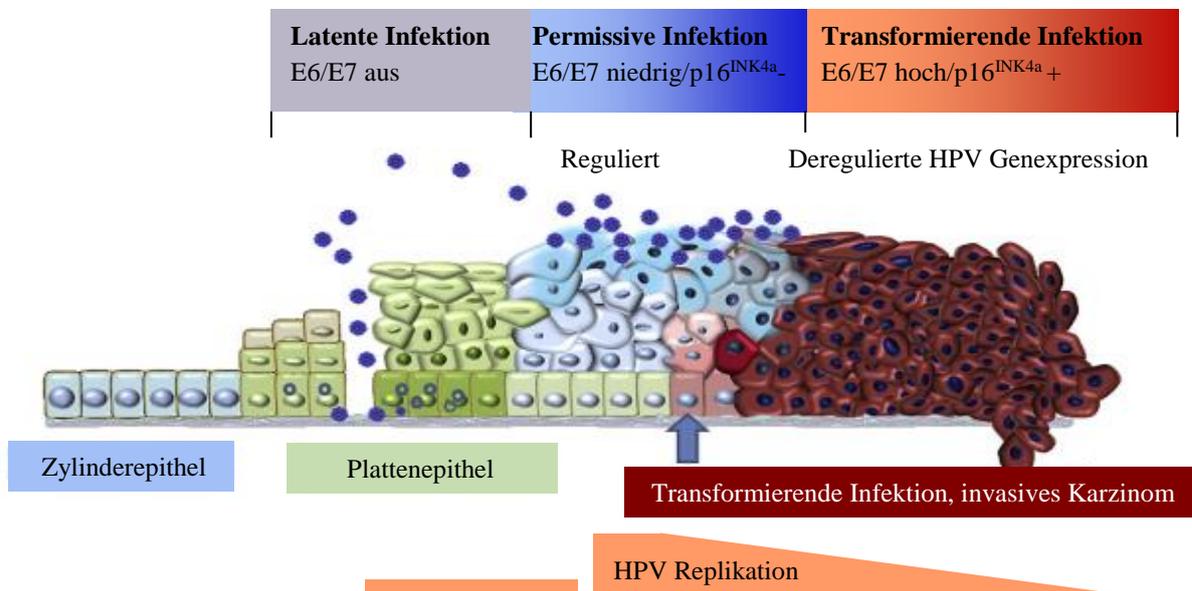


Abbildung 4: Möglicher Verlauf einer HPV-Infektion und ihrer Stadien an der zervikalen Transformationszone. (*E* = Early Gene, HPV = Humanes Papillomvirus) [Modifiziert nach von Knebel Doeberitz et al., 2009³²]

1.2.3 Progression einer HPV-Infektion zu Dysplasien

Die HPV-Infektion gehört zu den häufigsten sexuell übertragbaren Infektionen (STI), sodass sich ein Großteil der Frauen mindestens einmal in ihrem Leben damit ansteckt. Doch bei den meisten HPV-Infektionen handelt es sich um eine transiente Form, die innerhalb von ein bis zwei Jahren ausheilt.³⁹ Nur wenige HPV-Infektionen führen zur Entstehung eines Zervixkarzinoms oder von dessen Vorstufen. Umgekehrt ist jedoch zu vermerken, dass für eine derartige Veränderung eine HPV-Infektion nahezu unabdingbar ist.⁴⁰ Hierbei führen allerdings lediglich über einen längeren Zeitraum persistierende HPV-Infektionen zu einem erhöhten Transformationsrisiko des zervikalen Gewebes und damit einer möglichen Zellentartung.³⁹ Den bevorzugten Entstehungsort einer

Transformation bildet die sogenannte Transformationszone (TZ).³² Deren Ursprung bildet die zervikale Junctionszone, die bereits in der Kindheit die Grenzlinie zwischen dem ektozervikalen mehrschichtigen, nicht-verhornenden Plattenepithel und dem endozervikalen einreihigen, hochprismatischen Zylinderepithel darstellt. Aufgrund anatomischer und hormoneller Veränderungen während der Adoleszenz verschiebt sich die Position der zervikalen Junctionszone, wodurch ein Übergangsbereich mit metaplastischen Umbauprozessen und folglich Plattenepithelmetaplasien zwischen der ursprünglichen und der neuen Lokalisation entsteht. Dieses Areal wird als Transformationszone bezeichnet.^{41,42}

Um den Entstehungsmechanismus der Zell- und Gewebeveränderungen im transformierenden Stadium zu verstehen, müssen v. a. die hierbei überexprimierten Gensequenzen E6 und E7 des HPV betrachtet werden. Der Anstieg der Transkription dieser beiden Early Genes, die auch als virale Onkogene bezeichnet werden, entsteht durch fehlendes negatives Feedback des E2, welches oft durch einen DNA-Strangbruch, meist zwischen den Early Genes E1 und E2, im Rahmen der Virusintegration in die Wirtszelle bedingt wird.^{37,43} Weshalb es zur Aufnahme des HPV-Genoms in den Wirt kommt, wird nachfolgend erklärt.

Die Funktionen von E7

Unter physiologischen Bedingungen kann Cyclin D unter Einfluss von Wachstumsfaktoren die Bindung zwischen dem Retinoblastom-Protein (pRb) und dem Transkriptionsfaktor E2F auflösen, sodass letzteres, nun frei und aktiviert, über die Bildung bestimmter Proteine den Zellzyklus in die S-Phase überführen kann. Das dabei u. a. produzierte p16 (p16^{INK4a}) führt zu einer negativen Rückkopplung auf Cyclin D und verhindert so eine Überexpression von Zellzyklusproteinen wie MCM (Minichromosome Maintenance), PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen), Cyclin E und p14. Kommt es zu einer HPV-Infektion, kann das E7-Protein durch Bindung des pRb E2F freisetzen und dafür sorgen, die Zellen in die S-Phase zu überführen. Da dies unabhängig von Cyclin D erfolgt, wird der Mechanismus des negativen Feedbacks übergangen und eine durchgängige Proliferation der Zellen ist die Folge.⁴⁴ LR-HPV binden bei diesem Mechanismus schwächer als HR-HPV, sodass ihre Wirkung im Vergleich deutlich geringer ausfällt.⁴⁵ Weitere Funktionen des E7 bestehen in der Bindung an Histon-Deacetylasen, Komponenten des AP-1 (Activator Protein 1), und an die cyclinabhängigen Kinase Inhibitoren (CDKI) p21 und p27.³⁴ Letzteren ist es durch den Zusammenschluss mit E7 nicht mehr möglich, die cyclinabhängige Kinase (CDK) 2 zu hemmen, was ebenfalls den Übergang in die S-Phase unterstützt.⁴⁶ Darüber hinaus hat sich in Studien gezeigt, dass das E7-Protein, verstärkt durch das Zusammenspiel mit

dem E6-Protein, zu einer abnormen Zentrosomenzahl und folglich zu einer Genominstabilität und Fehlern bei der Mitose führen kann, wodurch vermutlich die Integration des Virusgenoms in die Wirtszelle wahrscheinlicher wird.^{47,48}

Die Funktionen von E6

Die nun dauerhaft proliferierende Zelle würde normalerweise über das in der S-Phase gebildete Zellzyklusprotein p14 den Tumorsuppressor p53 aktivieren, der wiederum die Zelle im Rahmen der DNA Damage Response in den programmierten Zelltod führt. Doch dies wird durch das E6-Protein verhindert. So verursacht dieses mithilfe des E6-assoziierten Proteins (E6-AP) einen Zusammenschluss mit p53, was eine Ubiquitinierung und infolgedessen die Degradation des Tumorsuppressors bewirkt.^{34,49,50} Weiterhin kann E6 die Telomeraseaktivität über eine gesteigerte Transkription des Telomerase-katalytischen Untergruppengens, Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT), erhöhen.⁵¹⁻⁵³ Dies führt zu einer Verlängerung der Telomere und damit zu einer Hemmung der Zellseneszenz. Beide durch E6 ausgelösten Mechanismen erhöhen die Lebensspanne HPV-infizierter Zellen und unterstützen damit deren Transformation.³⁴

Zusammengefasst führen also die Onkogensequenzen E7 und E6 zum einen zu einer erhöhten Zellproliferation und einer verlängerten Lebensdauer infizierter Zellen. Auf der anderen Seite bedingen sie eine Genominstabilität, durch welche die Integration des Virusgenoms in die Zielzelle angestoßen und daraus folgend die andauernde Zellproliferation durch das Virus selber reguliert wird, was eine Transformation der Zelle ermöglicht. E5 dient dabei der Unterstützung der beiden Sequenzen.⁵⁴ Der Ablauf der Transformation wird in Abbildung 5 veranschaulicht.

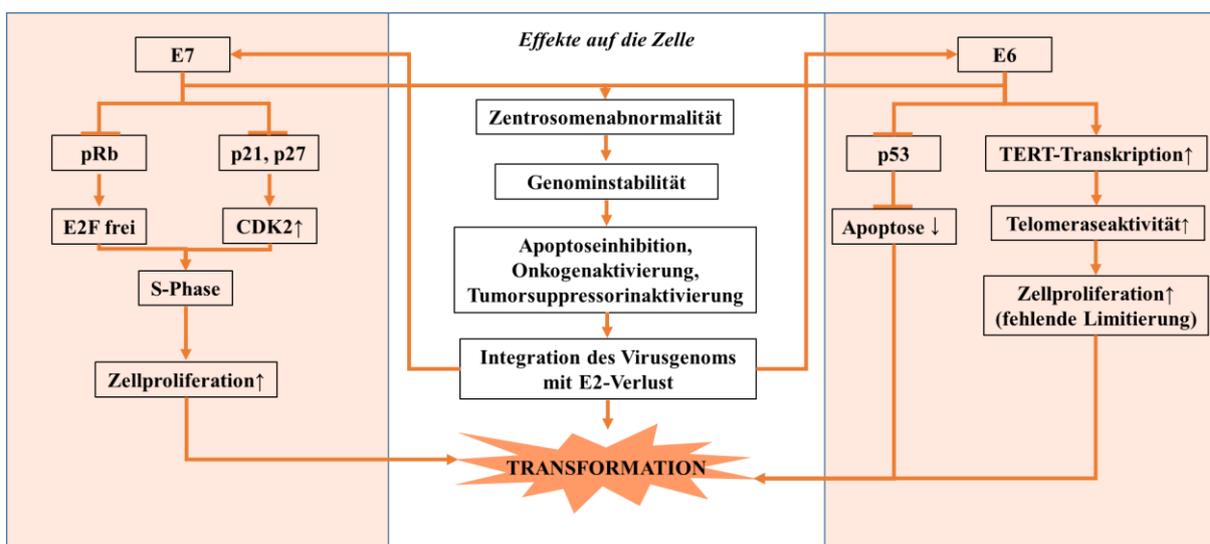


Abbildung 5: Interaktionen der HPV-Onkoproteine E7 und E6 mit zellulären Regulatoren und deren Effekte bei der Entstehung des Zervixkarzinoms. (CDK = Cyclin-Dependent Kinase, E = Early Gene, HPV = Humanes Papillomvirus, p21 und p27 = Cyclin-Dependent Kinase Inhibitoren, p53 = Tumorsuppressor, pRB = Retinoblastom-Protein, TERT = Telomerase-Reverse-Transkriptase)

1.3 Prävention

Dieses Wissen um die Ursachen des Zervixkarzinoms und dessen Vorstufen bildet den Grundstein für den gezielten Einsatz von Präventionsmaßnahmen.

1.3.1 Primärprävention

So empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) seit 2007 zur Primärprävention des Zervixkarzinoms für alle Mädchen eine HPV-Impfung.⁵⁵ Aktuell sind dabei im Alter von 9 bis 14 Jahren, vor dem ersten sexuellen Kontakt, zwei Impfdosen im Abstand von mindestens 5 Monaten vorgesehen. Sollte der Impfbeginn im Alter von 15 bis 17 Jahren erfolgen oder der Impfabstand von mindestens 5 Monaten nicht eingehalten worden sein, ist eine dritte Impfung erforderlich. Ziel der Impfung ist die Reduktion der Krankheitslast durch HPV-assoziierte Tumore.⁵⁶ Eine Metaanalyse mit Studien aus den Jahren 2007 bis 2014 konnte bereits einen Rückgang von HPV-Infektionen seit Einführung der HPV-Impfung für Mädchen zeigen und zwar nicht nur bei den Geimpften, sondern aufgrund einer Herdenimmunität auch bei Nicht-Geimpften.⁵⁷ Dies bekräftigen auch Chow et al. 2017 mit ihrer Studie über die Infektionsentwicklung von HPV in Australien seit Einführung der quadrivalenten HPV-Impfung der Mädchen/Frauen dort. Diese verzeichnet einen Rückgang der Prävalenz von HPV-Infektionen der Genotypen 6, 11, 16 und 18 bei ungeimpften australisch-stämmigen Männern alleine durch Impfung weiblicher Einheimischer.⁵⁸

Die Grundlage einer solchen HPV-Impfung ist dabei ein L1 VLP (Virus-Like Particle), eine leere Virushülle, welche durch Stimulation körpereigener Antikörper die Bindung des Virus an die Basalmembran, den Initialschritt der HPV-Infektion (s. Kapitel 1.2.2), verhindert.⁵⁹ Mit diesem Wirkmechanismus sind in Deutschland seit 2007 bzw. 2016 die beiden Impfstoffe Cervarix (bivalent: HPV 16 und 18) und Gardasil 9 (nonavalent: HPV 6, 11, 16, 18, sowie 31, 33, 45, 52 und 58), das Folgeprodukt von Gardasil (quadrivalent: HPV 6, 11, 16 und 18), zugelassen.⁶⁰ Wird die Impfung rechtzeitig vor der ersten HPV-Infektion beendet, kann diese sogar bis zu 100 % Impfschutz gegen die Entwicklung von CIN-Läsionen/Dysplasien bieten.⁶¹ Darüber hinaus gibt es Anzeichen dafür, dass die HPV-Impfung aufgrund von Kreuzprotektionen auch gegen Infektionen mit HPV-Genotypen schützt, auf die der Impfstoff nicht primär abzielt.⁶²

Studien der letzten Jahre zufolge fällt die Impfbereitschaft unter Mädchen des relevanten Alters in Deutschland allerdings eher gering aus. So waren im Jahr 2015 44,6 % der 17-jährigen und 31,3 % der 15-jährigen Mädchen vollständig gegen HPV geimpft.⁶³ Da das Erreichen einer

Herdenimmunität mit einer Impfbeteiligung unter 50 % kaum möglich ist und HPV darüber hinaus insbesondere bei Männern Oropharynxkarzinome verursachen kann, empfiehlt die STIKO seit Anfang Juni 2018 auch das Impfen von Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren.⁶⁰ Des Weiteren ist trotz Impfung weiterhin eine regelmäßige Sekundärprävention für eine dauerhaft niedrige Zervixkarzinomprävalenz essentiell, weil nicht alle karzinogenen HR-HPV Genotypen in den Impfstoffen eingeschlossen sind und die Impfquote nicht ausreichend ist.

1.3.2 Sekundärprävention

Die Sekundärprävention dient neben der Früherkennung des Zervixkarzinoms auch zu dessen Vorbeugung, da so Präkanzerosen diagnostiziert und chirurgisch therapiert werden können. Bislang wurde Frauen ab einem Alter von 20 Jahren jährlich eine zytologische Untersuchung empfohlen und nur dann eine weitere Diagnostik, wie HPV-Test, Kolposkopie und histologische Untersuchung durchgeführt, wenn diese auffällig war.^{5,21,64} Da diese Methode jedoch eine geringe Sensitivität (Sens.) aufweist und damit nur etwa die Hälfte aller Patientinnen mit Krebsvorstufen erkannt werden,^{5,65} hat der Gemeinsame Bundesausschuss (G-BA) im September 2016 beschlossen, ab Januar 2020 allen Frauen ab 35 Jahren anstelle der jährlich zytologischen Untersuchung alle 3 Jahre eine Kombination aus zytologischem Abstrich und HPV-Diagnostik anzubieten.⁶⁶ Einige Studien haben gezeigt, dass diese Kombination im Vergleich zur alleinigen Zytologie deutlich mehr CIN2+-Erkrankungen detektiert.⁶⁷ Frauen zwischen dem 20. und 34. Lebensjahr können weiterhin jährlich einen zytologischen Abstrich durchführen lassen.²¹

Screening mittels Zytologie

Bei einer gynäkologisch zytologischen Untersuchung werden Zellen der Portio und somit auch der TZ des Gebärmutterhalses unter einem Mikroskop begutachtet. Dabei kann die Untersuchung entweder mittels konventioneller PAP-Methode, bei der das auf einer Bürste bzw. einem Spatel erfasste Zellmaterial auf einem Objektträger ausgestrichen und fixiert wird,⁶⁸ oder mittels Dünnschichtzytologie erfolgen. Bei der zuletzt genannten flüssigkeitsbasierten Zytologie (LBC) wird das Material ebenfalls mit einer Bürste und/oder einem Spatel aus dem Bereich der Endo- und Ektozervix gewonnen, dann aber in einer Lösung fixiert. Obwohl diese beiden Methoden bezüglich ihrer Sens. für CIN2+-Erkrankungen keine wesentlichen Unterschiede aufweisen und die Dünnschichtzytologie deshalb noch nicht verpflichtend ins gesetzliche Früherkennungsprogramm in Deutschland aufgenommen wurde, wurde diese in einigen anderen Ländern aufgrund zusätzlicher Vorteile bereits als Methode der Wahl eingeführt.^{21,64} Dazu zählen

eine um 27 % kürzere Mikroskopierdauer, die Möglichkeit von Zusatztests mit demselben Material (Reflextestung), aber auch eine verbesserte Probenqualität.²¹ Zur mikroskopischen Analyse wird in Deutschland bei beiden Verfahren die Münchner Nomenklatur, die von der Koordinations-Konferenz-Zytologie (KoKoZyt) entworfen und zuletzt im November 2013 überarbeitet wurde, herangezogen. Tabelle 1 zeigt eine Gegenüberstellung der neuen und alten Münchner Nomenklatur III bzw. II sowie des internationalen Bethesda-Systems.^{69,70} PAP IIw/IIIk (w für Wiederholung, k für Kontrolle), in Deutschland inoffizielle Kategorien der Münchner Nomenklatur II, stehen für unklare Befunde und werden äquivalent zu ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) im Bethesda-System benutzt.

Laut der Metaanalyse von Cuzick et al. liegt die Sens. des zytologischen Abstrichs bei 53 % (48,6 %–57,4 %) bei einer durchschnittlichen Spezifität (Spez.) von 96 % (96,1 %–96,5 %).⁶⁵ Das vor einigen Jahren eingeführte p16-Ki-67-Dual-Stain-Verfahren kann als Zusatzfärbemethode die Sens. zwar erhöhen, aber nicht in einem zufriedenstellenden Maß, sodass der G-BA seit Januar 2020 auf die Kombinationsuntersuchung mit einem HPV-Test setzt.^{66,71}

Einleitung

Tabelle 1: Münchner Nomenklatur III und II im Vergleich mit dem Bethesda-System. [Modifiziert nach KoKoZyt, 2013⁶⁹ und Synlab, 2017⁷⁰]

MN III		MN II	Bethesda-System
0	Unzureichendes Material → <i>Abstrichwiederholung</i>	0	Unsatisfactory for evaluation
I	Unauffällige und unverdächtige Befunde → <i>Abstrich im Vorsorgeintervall</i>	I/II	NILM
II-a	Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese → <i>ggf. zytologische Kontrolle wegen auffälliger Anamnese</i>		
II	Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert		
II-e	Endometriumzellen bei Frauen > 40. Lebensjahr in der zweiten Zyklushälfte → <i>Klinische Kontrolle unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischem Befund</i>	II/ (IIw/ IIk)/ III	Endometrial cells
II-p	Plattenepithelzellen mit geringergradigen Kernveränderungen als bei CIN1, auch mit koilozytärem Zytoplasma/Parakeratose → <i>ggf. zytologische Kontrolle unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischem Befund</i>	(IIw/ IIk)	ASC-US
II-g	Zervikale Drüsenzellen mit Anomalien, die über das Spektrum reaktiver Veränderungen hinausreichen → <i>ggf. zytologische Kontrolle in Abhängigkeit von Anamnese und klinischem Befund</i>		AGC endocervical NOS
III	Unklare bzw. zweifelhafte Befunde		
III-p	CIN2/CIN3/Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen → <i>Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden, evtl. kurzfristige zytologische Kontrolle nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung</i>	III	ASC-H
III-g	Ausgeprägte Atypien des Drüsenepithels, Adenocarcinoma in situ/invasives Adenokarzinom nicht auszuschließen → <i>Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden</i>		AGC endocervical favor neoplastic
III-e	Abnorme endometriale Zellen (insbesondere postmenopausal) → <i>Weiterführende klinische Diagnostik, ggf. mit histologischer Klärung</i>		AGC endometrial
III-x	Zweifelhafte Drüsenzellen ungewissen Ursprungs → <i>Weiterführende Diagnostik (zum Beispiel fraktionierte Abrasio; ggf. additive Methoden/Differentialkolposkopie)</i>		AGC favor neoplastic
IIID	Dysplasiebefunde mit größerer Regressionsneigung		
IIID1	Zellbild einer leichten Dysplasie analog CIN1 → <i>Zytologische Kontrolle in 6 Monaten, bei Persistenz > 1 Jahr: ggf. additive Methoden/Differentialkolposkopie</i>	IIID	LSIL
IIID2	Zellbild einer mäßigen Dysplasie analog CIN2 → <i>Zytologische Kontrolle in 3 Monaten, bei Persistenz > 6 Monate: Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden</i>		HSIL
IV	Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms → <i>Differentialkolposkopie und Therapie</i>		
Iva-p	Zellbild einer schweren Dysplasie/eines Carcinoma in situ analog CIN3	IVa	HSIL
Iva-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ		AIS
IVb-p	Zellbild einer CIN3, Invasion nicht auszuschließen	IVb	HSIL suspicious for invasion
IVb-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen		AIS suspicious for invasion
V	Malignome → <i>Weiterführende Diagnostik mit Histologie und Therapie</i>		
V-p	Plattenepithelkarzinom	V	Squamous cell carcinoma
V-g	Endozervikales Adenokarzinom		Endocervical adenocarcinoma
V-e	Endometriales Adenokarzinom		Endometrial adenocarcinoma
V-x	Andere Malignome, auch unklaren Ursprungs		Other malignant neoplasms

AGC = Atypical Glandular Cells, AIS = Adenocarcinoma In Situ, ASC-H = Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, Cannot Rule Out HSIL, ASC-US = Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, HSIL = High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL = Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, MN = Münchner Nomenklatur, NILM = Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, NOS = Not Otherwise Specified

Screening mittels HPV-Test

Der eben erwähnte, bislang nur zur Abklärung auffälliger Befunde benutzte HPV-Test schützt laut Ronco et al. etwa 60–70 % effektiver vor Zervixkarzinomen als der zytologische Abstrich.⁷² Möglich ist dies v. a. aufgrund seiner hohen Sens., die in der Metaanalyse von Koliopoulos et al. aus dem Jahr 2017 mit dem Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV- DNA-Test (HC2) für CIN2+ bei 92,6 % (89,6 %–95,3 %) lag.⁷³ Da seine Spez. jedoch niedriger ist als die der Zytologie (in der genannten Metaanalyse 89,3 % (87,0 %–91,2 %) ⁷³) und viele HPV-Infektionen, wie oben bereits erwähnt, spontan ausheilen, kam es zum Entschluss, die beiden Methoden zu kombinieren.⁶⁶ Die Altersgrenze für diese Kombinationsuntersuchung wurde auf das 35. Lebensjahr festgesetzt⁶⁶, denn HPV-Infektionen verlaufen bei jüngeren Frauen häufiger transient selbstlimitierend als bei älteren Frauen.⁷⁴ Daher steigt die Spez. des Tests mit zunehmenden Alter deutlich an. Viele andere Länder verzichten sogar gänzlich auf das zytologische Screening, sodass die Vorsorgeuntersuchung dort allein auf dem HPV-Test basiert.⁷⁵

Aufgrund der Forschungsergebnisse der letzten Jahre entstand ein großer Markt mit vielen verschiedenen HPV-Tests, was wiederum eine genaue Validierung dieser Tests erfordert. Hierfür werden in den deutschen Leitlinien die Konsortialkriterien von Meijer et al. und Stoler et al. herangezogen, die neben einer Inter- und Intralaborreproduzierbarkeit von 90 % v. a. eine Sens. und eine Spez. für die Detektion von CIN2+-Läsionen fordern, die mindestens 90 % bzw. 98 % der zwei als Goldstandard definierten HPV-Testmethoden, HC2 und GP5+/6+ PCR Enzymimmunoassay, aufweisen.^{21,76,77} Tabelle 2 listet die Testverfahren auf, die aktuell diese Kriterien erfüllen. Es kommen aber ständig weitere hinzu. Die letzte Spalte zeigt, welche von ihnen in den USA bzw. in der EU bereits zugelassen sind. Des Weiteren ist zu erkennen, ob sich das jeweilige Testverfahren auf eine Detektion von DNA oder RNA (Ribonukleinsäure) stützt, ob der Test die einzelnen HR-HPV-Genotypen detektiert oder nur kumulativ die Präsenz von HR-HPV angibt und ob dies über eine Target- oder Signalamplifikation erreicht wird. Eine sogenannte Targetamplifikation, welche das Zielmolekül direkt vervielfältigt und misst, hat dabei eine hohe Sens., wohingegen die Signalamplifikation nur das detektierte Signal amplifiziert, und so die Quantität des Targetmoleküls, also die Viruslast, mitbestimmt werden kann.^{21,78}

Einleitung

Tabelle 2: Liste häufig verwendeter HPV-Tests, die die festgelegten Kriterien der deutschen Leitlinie AWMF erfüllen. [Modifiziert nach S3 Leitlinien, 2017²¹ und Arbyn et al., 2015⁷⁸]

Test	Hersteller	Amplifikationstyp	Testsystem	Genotypisierung/Typen	Zulassung für USA (FDA) und Europa (CE)
Digene Hybrid® Capture 2 High-Risk-HPV-DNA-Test	QIAGEN Gaithersburg	Signalamplifikation	DNA (ganzes Genom)	NEIN (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)	FDA, CE
Cobas® HPV-Test	Roche Diagnostics	Targetamplifikation	DNA (L1)	JA (16, 18) NEIN (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	FDA, CE
Cervista™ HPV HR und Genfind™ DNA Extraction Kit	Hologic	Signalamplifikation	DNA (E6, E7, L1)	JA (16, 18) NEIN (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	FDA, CE
APTIMA® HPV Assay	Hologic	Targetamplifikation	RNA (E6, E7)	NEIN (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	FDA, CE
Abbott RT High-Risk-HPV-Test	Abbott	Targetamplifikation	DNA (L1)	JA (16, 18) NEIN (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	
BD Onclarity™ HPV-Test	BD Diagnostics	Targetamplifikation	DNA (E6, E7)	JA (16, 18, 31, 45, 51, 52; 33–58; 56–59–66; 35–39–68)	CE
Papillocheck® HPV-Test	Greiner Bio-One	Targetamplifikation	DNA (E1)	JA (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82, 6, 11, 40, 42, 43, 44)	

CE = Conformité Européenne, DNA = Desoxyribonucleic Acid, E = Early Gene, FDA = Food and Drug Administration, HPV = Humanes Papillomvirus, L = Late Gene, RNA = Ribonucleic Acid

Kolposkopie, Histologie und Konisation

Kommt es zu Auffälligkeiten in den oben genannten Screeninguntersuchungen, kann eine Kolposkopie mit der Option einer Knipsbiopsie, dem Goldstandard zur Diagnosestellung eines Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen, durchgeführt werden. Bei der kolposkopischen Untersuchung wird mithilfe einer Vergrößerungsoptik die Portio inspiziert, wobei häufig auch eine Iod- und Essigprobe angewandt wird, um meta- bzw. dysplastische Veränderungen der Portiooberfläche besser sichtbar zu machen.²¹ Mithilfe der Nomenklatur der IFCPC (International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy), die ganz grundsätzlich zwischen „Normal Findings“, „Abnormal Findings“ mit „Minor Changes“ und „Major Changes“ sowie „Suspicious for Invasion“ unterscheidet, soll eine Standardisierung der Untersuchungsauswertung erreicht werden.⁷⁹ Da für ein adäquates Gelingen der Kolposkopie das Einsehen der TZ besonders wichtig ist⁴², sollen auch die Beobachtungen hierzu mittels Einteilung in drei Grade notiert und standardisiert werden. Dabei kann man bei einer sogenannten T1 die TZ vollständig ektozervikal, bei einer T2 diese zwar vollständig, aber innerhalb des Zervikalkanals und bei einer T3 diese nicht

oder unvollständig erkennen.^{21,80} Dennoch bedingt unter anderem die Subjektivität und limitierte Reproduzierbarkeit der Kolposkopie eine geringe Sens. und Spez., sodass diese für das Screening keinerlei Bedeutung hat und ausschließlich als Abklärungsuntersuchung dient.²¹ Mithilfe der an einer kolposkopisch auffälligen Stelle entnommenen Biopsie kann der Pathologe anschließend eine Aussage bezüglich des histologischen Zustands der Portio bzw. der Läsion machen. Neben einem Zervixkarzinom lassen sich dabei die Präkanzerosen anhand histologischer Merkmale, wie z. B. Koilozyten, Mitosen und Zellkernveränderungen, in den Stufen CIN1–3 diagnostizieren.⁸¹ Eine alternative Einteilung der Präkanzerosen, LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology) genannt, wurde 2013 eingeführt. Diese basiert auf einer Kombination aus der eben beschriebenen morphologischen Bewertung und einer immunhistochemischen Färbung mit Biomarkern, wie v. a. den Tumorsuppressorproteinen p16, Ki-67 und Stathmin. Letztere weisen eine hohe Spez. für zervikale Dysplasien auf.⁸²⁻⁸⁴ Tabelle 3 stellt das alternative LAST-System der klassischen CIN-Einteilung gegenüber, wobei ersteres eine gröbere Differenzierung vornimmt, die zum Teil bereits das Stadium CIN 2 als High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) einstuft. Da eine CIN2 bei jüngeren, unter 25-jährigen Patientinnen zu 60 % innerhalb von zwei Jahren ausheilt, ist hier jedoch eine konservative Therapie und nicht die einer HSIL anzustreben. Daher sollte die CIN-Einteilung immer zur Therapieentscheidung einbezogen werden.⁸⁵

Tabelle 3: Vergleich der histologischen Einteilungssysteme von Präkanzerosen, LAST und CIN.^{82,84}

LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology)	CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia)
LSIL (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)	CIN1 CIN2 + p16 negativ
HSIL (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)	CIN2 + p16 positiv CIN3

Als nächster diagnostisch-therapeutischer Schritt würde bei präkanzerösen Auffälligkeiten in der histologischen Untersuchung eine Konisation, das Entfernen der Läsion mittels Laser oder elektrischer Schlinge, folgen. Aufgrund ihrer Nebenwirkungen, v. a. in Bezug auf eine folgende Schwangerschaft (Frühgeburtslichkeit, Zervixinsuffizienz, Folgen für das Neugeborene), ist hierfür eine zuverlässige Indikationsstellung, z. B. durch genaue Triagierung, von großer Bedeutung.^{86,87}

1.4 Relevante Biomarker für das Zervixkarzinom und seine Vorstufen

Mithilfe spezifischer Biomarker für das Zervixkarzinom und dessen Vorstufen kann ein Abstrich darüber hinaus auf molekularbiologischer Ebene beurteilt werden. Ein großer Vorteil dabei ist, dass im Gegensatz zur Zytologie und Kolposkopie eine objektive und reproduzierbare Beurteilung bezüglich des vorliegenden Krankheitsstadiums möglich ist. Nachfolgend werden einige für das Zervixkarzinom und seine Vorstufen relevante Biomarker vorgestellt.

HPV-Genotypisierung anhand viraler Onkoproteine und Splicemarker

Das onkogene Potential der HPV E7-Sequenz wurde in Kapitel 1.2.3 bereits beschrieben. Laut Baron et al. steht die Aktivität von E6/E7-mRNA in Korrelation mit dem Schweregrad einer zervikalen Dysplasie.⁸⁸ Mithilfe einer quantitativen Detektion der HPV E7-Sequenz kann neben der Genotypisierung auch die Bestimmung des am stärksten exprimierten, somit „führenden“, wahrscheinlich dysplasieverursachenden HPV-Genotyps vorgenommen werden.

Schmitt et al. haben 2009 mit dem Wissen, dass häufig HPV 16 die Ursache des Zervixkarzinoms ist, das Transkript dieses Genotyps analysiert. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen HPV 16 mRNA-Splicevarianten und den zervikalen Dysplasiestadien entdeckt. So zeigten sich E6*I (226/409) und E1C (880/2582), welche direkt bzw. indirekt über Transaktivierung der LCR oder Suppression von E2 für die Synthese von E7 verantwortlich sind, in schwerwiegenden Läsionen erhöht.⁸⁹⁻⁹¹ Die Aufgabe der E1^E4-mRNA-Sequenz (880/3358) dagegen besteht – über die Expression von E4 – in der Vervielfältigung der Virus-DNA und der Initiierung der Kapsidbildung und Virusfreisetzung, wie es für produktive Infektionen typisch ist.⁹² Bei Karzinomen scheint diese mRNA-Splicesequenz dagegen in geringerer Konzentration vorzuliegen.⁸⁹ Höfler et al. bestätigen, dass mithilfe der drei in Abb. 6 dargestellten mRNA-Splicesequenzen zwischen verschiedenen Infektionsstadien unterschieden werden kann.⁹³ Weshalb es zu diesen Modifikationen im mRNA-Virustranskriptom von HPV 16 kommt, ist bislang jedoch unbekannt.

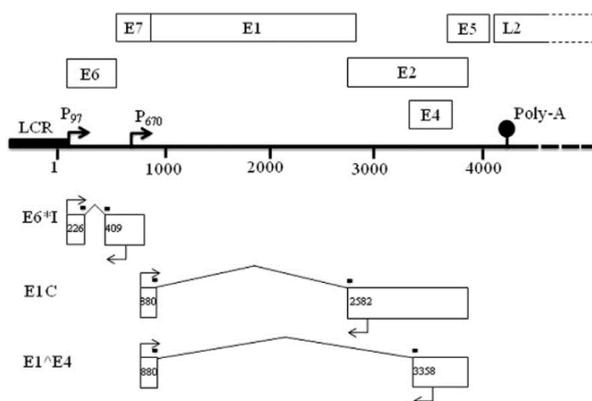


Abbildung 6: Das humane Papillomvirus (HPV) 16 Genom mit den relevanten gesplitten mRNA-Sequenzen. (*E* = Early Gene, *L* = Late Gene, *LCR* = Long Control Region, *P97* und *P670* = Promotoren) [Quelle: Höfler et al., 2015⁹³]

Marker der zervikalen Junctionszone (squamocolumnar junction: SCJ)

Zervixkarzinome und High-Grade CIN-Läsionen finden sich fast ausschließlich im Bereich der zervikalen Junctionszone (s. Kapitel 1.2.3). Auch wenn die Gründe hierfür noch nicht bekannt sind, wurde in diesem Bereich eine kleine Population kuboider Epithelzellen nachgewiesen, welche anhand fünf spezifischer Antikörper detektiert werden können. Zu diesen zählen u. a.

Keratin 7 (KRT7) und die Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP7). Herf et al. zeigen, dass diese fünf Antikörper in ihrer Studie in allen High-Grade CIN-Läsionen (CIN2+) und Karzinomen exprimiert waren, während Low-Grade CIN zum Großteil (34 von 42) an anderen Stellen, etwa der Ektozervix bzw. der TZ, zu finden sind und somit keine Antikörperfärbung sichtbar war. Dies lässt auf eine Korrelation zwischen SCJ-Biomarkern und dem Stadium einer CIN-Läsion schließen.⁴²

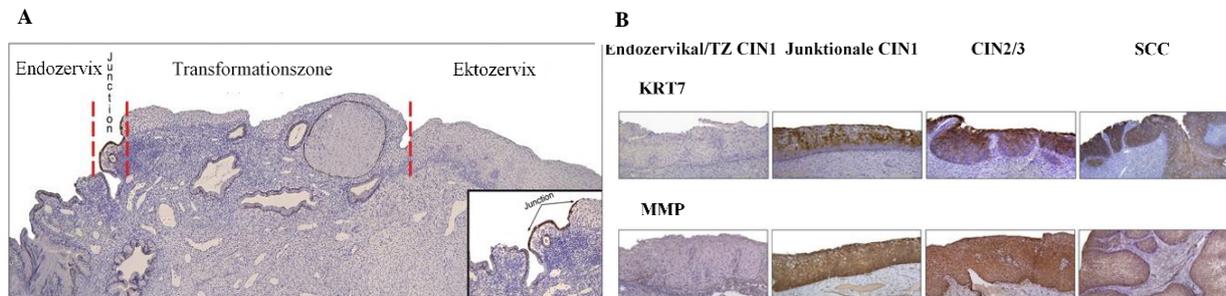


Abbildung 7: A) Darstellung der zervikalen Junctionalzone. B) KRT7- und MMP7-Färbungen der zervikalen Junctionalzone in den verschiedenen Dysplasiestadien. (CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, KRT7 = Keratin 7, MMP7 = Matrix-Metalloproteinase 7, SCC = Squamous Cell Carcinoma, TZ = Transformationszone) [Modifiziert nach Herfs et al., 2012⁴²]

Zelluläre Onkoproteine und Stammzellmarker

BIRC5/Survivin, aus der Familie der Apoptoseinhibitoren, ist am Schutz vor einer Zellapoptose und der Regulation der Mitose beteiligt.⁹⁴ Während dieser Biomarker in differenziertem Gewebe kaum auffindbar ist, kommt es bei fast allen Karzinomen zu dessen Überexpression.⁹⁵ Grund dafür ist beim Zervixkarzinom die durch das virale Onkoprotein E6 bedingte Degradation des Tumorsuppressors p53, welcher im gesunden Gewebe BIRC5 hemmt.^{96,97} Dessen erhöhte Expression bei Karzinomen steht darüber hinaus im Zusammenhang mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, einer erhöhten Rezidivrate, einem verkürzten Gesamtüberleben sowie einer Resistenz gegen Chemo- und Radiotherapie.^{98,99}

Während jeder Zellteilung kommt es zur Verkürzung der Telomere, was jedoch bei einer transformierenden HPV-Infektion durch das virale Onkoprotein E6 verhindert wird. Denn dieses erhöht die TERT-Produktion und daraus folgend die Telomeraseaktivität und kann somit die Zellseneszenz und den Zelltod verhindern.³⁴ Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von TERT mit dem zytologischen Schweregrad einer zervikalen Läsion korreliert und dabei bereits in frühen Stadien registriert wird.¹⁰⁰

In der Karzinogenese können Stammzellen im Zusammenspiel mit HPV-Onkogenen und zellulären Veränderungen zu Krebsstammzellen umgewandelt werden. Das Vorhandensein dieser Krebsstammzellen lässt sich mithilfe von Stammzellmarkern nachweisen. Aus diesem Grund haben Tulake et al. Biopsien von Zervixkarzinomen und dessen Vorstufen mittels quantitativer

Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) auf eben solche Stammzellmarker hin untersucht. Sie fanden bei allen Zervixkarzinomen eine signifikante Erhöhung von ALDH1A1 (Aldehyde Dehydrogenase 1 A1), NANOG, POU5F1 (OCT4 = Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4) und SOX2 (Sex Determining Region Y-Box 2) im Vergleich zu dysplasiefreiem Zervixgewebe. OCT4 und ALDH1A1 aus der Familie der ALDH-Enzyme, welche für die Entgiftung von Ethanol-Stoffwechselprodukten verantwortlich und somit für das Überleben von Zellen unabdingbar sind, zeigten auch signifikante Unterschiede zwischen CIN2–3 und dysplasiefreiem Zervixgewebe.¹⁰¹

Als weiteren Stammzellmarker des Zervixkarzinoms haben Escobar-Hoyos et al. in ihrer Arbeit 2014 Keratin 17 (KRT17), ein Intermediärfilament des Zytoskeletts, validiert. Sie konnten eine signifikante Erhöhung dieses Markers bei HSIL und Plattenepithelkarzinomen der Zervix im Vergleich zu Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions (LSIL) und dysplasiefreiem ektozervikalem Gewebe zeigen. Darüber hinaus soll KRT17 signifikant ($p = 0,009$) mit einer verminderten Überlebensrate von Patientinnen mit zervikalem Plattenepithelkarzinom assoziiert sein. So lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem niedrigen KRT17-Wert bei 96,67 % und bei einem hohen hingegen bei 64,31 %. KRT17 kann somit als Biomarker sowohl eine Aussage über den Schweregrad der Erkrankung als auch über den prognostischen Überlebensverlauf machen.¹⁰²

p63, aus der Familie der p53-Proteine, fördert die Stammzellproliferation in der Basalschicht, die Regulation der Zelldifferenzierung und die DNA Damage Response (Reparatur der DNA). Eldakhahny et al. bestätigen in ihrer Arbeit, dass bei Zervixkarzinomen die Onkogenesequenz E7 dessen vermehrte Transkription induziert.¹⁰³ Eine Studie von Das et al. 2018 konnte zeigen, dass p63 bei Zervixkarzinomen im gesamten Epithel verteilt ist, während es im gesunden zervikalen Gewebe nur in der Basalzellregion gefunden wird. Sie konnten auch eine Erhöhung von p63 bei transformierenden Infektionen verzeichnen und darüber hinaus eine Korrelation zwischen der Expressionshöhe dieses Markers und dem Schweregrad einer zervikalen Dysplasie beweisen.¹⁰⁴

Tumorsuppressoren

Tumorsuppressoren sind Proteine, die für die Zellzykluskontrolle und Apoptoseinduktion (programmierter Zelltod) im Falle eines DNA-Schadens zuständig sind. Zu diesen zählt u. a. p53, Wächter des Genoms,¹⁰⁵ das während der Karzinogenese in der Zervix durch das Onkoprotein E6 degradiert und damit funktionsunfähig gemacht wird.⁵⁰ Ob die Messung der RNA dieses Proteins eine Aussage über das Stadium des Zervixkarzinoms zulässt, ist noch nicht bekannt.

Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben reguliert p16, auch als CDKN2A bekannt, über Inhibierung von Cyclin D/CDK den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus. Da dieser Übergang bei einer HPV-

Infektion jedoch unabhängig von Cyclin D/CDK, autonom von der Onkogenesequenz E7, eingeleitet wird, kommt es zu einer Erhöhung von p16, ohne dass dies die Beendigung des Übergangs bewirkt. p16, ein Biomarker dessen Erhöhung somit auf eine Überexpression von E7 und damit auf eine Transformation der Zelle hindeutet, ist bereits Teil der immunzytochemischen bzw. -histochemischen Färbung der Sekundärprävention.^{21,44} Zudem konnten Clarke et al. feststellen, dass die Triagierung mithilfe des p16-Ki-67-Dual-Stain-Verfahren im Gegensatz zur alleinigen Zytologie eine deutlich verbesserte Risikostratifizierung über 5 Jahre bietet.¹⁰⁶

Proliferationsmarker

Stathmin, auch als Onkoprotein 18 bezeichnet, ist ein Mikrotubulidestabilisator, der ubiquitär exprimiert wird und in die Regulation der Mikrotubulidynamik und damit des Zytoskeletts sowie die der Mitose involviert ist.¹⁰⁷ Reguliert wird Stathmin normalerweise durch CDKI p27,¹⁰⁷ welches bei einer HPV-Infektion durch die Onkogenesequenz E7 gehemmt wird,¹⁰⁸ sodass bei transformierenden Läsionen der Zervix eine Überexpression von Stathmin nachweisbar ist. In der immunhistochemischen Färbung konnten Howitt et al. nachweisen, dass Stathmin aus diesem Grund spezifisch für High-Grade Dysplasien (CIN3+) der Zervix ist.⁸³

Ki-67 oder MiKi67 ist ein Protein, das während allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, G2 und Mitose) nachweisbar und nur während der G0-Phase abwesend ist. Aus diesem Grund stellt es einen geeigneten Marker der Zellproliferation dar.¹⁰⁹ Zusammen mit p16 wird es, wie oben erwähnt, bereits im immunzytologischen und -histologischen p16-Ki-67-Dual-Stain-Verfahren verwendet und kann der Triagierung HPV-positiver Patientinnen dienen.¹¹⁰

Neben der Topoisomerase 2 α (TOPO2 α), einem Enzym, das durch Aufbrechen der DNA und Änderungen der Topologie die Transkription erst ermöglicht¹¹¹, spielt auch MCM2 eine wichtige Rolle in der Karzinomzellproliferation. Letzteres gehört zur Familie der Minichromosome Maintenance Proteine und ist in die Initiierung der Genomreplikation involviert.¹¹² Zheng et al. konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass bei zervikalen Läsionen MCM2 überexprimiert ist und mit dem Vorhandensein von HPV-Genotypen positiv korreliert.¹¹³

Zellularitätsmarker

Sowohl in gesunden, als auch in HPV-infizierten Zervixepithelzellen und zervikalen Dysplasien konnten Steinau et al. einen stabilen Wert für das Haushaltsgen Actin- β nachweisen.¹¹⁴ Aus diesem Grund kann mit diesem Marker die Zellularität der Proben, die der Quantifizierung der oben genannten Biomarker dient, bestimmt werden. Ein weiteres Haushaltsgen ist Ubiquitin C (UBC).

2 Fragestellung

Mit der seit Januar 2020 eingeführten Erweiterung des zytologischen Zervixkarzinomscreenings durch einen HPV-Test für Frauen ab dem 35. Lebensjahr steigt vermutlich die Sens. der Vorsorge, jedoch nicht deren Spez.⁶⁶ Viele HPV-Infektionen und auch CIN-Läsionen, die damit vermehrt detektiert werden, heilen spontan aus, sodass durch diese Kombinationsdiagnostik die Gefahr der Überdiagnostik mit potentiellen Nebenwirkungen (s. Kapitel 1.3.2) besteht.^{76,86} Um dies zu vermeiden und HPV-positive Frauen ohne Entnahme einer Biopsie besser triagieren zu können, kann eine Messung spezieller Biomarker, u. a. der oben genannten, eine sinnvolle Methode sein.

2.1 Forschungskontext dieser Arbeit

Eine Methode, die Biomarker in Abstrichen bestimmt und bereits in die Sekundärprävention aufgenommen wurde, ist die immunzytochemische p16/Ki67-Färbung (CINtec® Plus, Roche), die nach uneindeutiger Zytologie eine Aussage zum Vorhandensein transformierter Zellen macht.^{21,71}

Der QG-MPH (QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology) Test basiert auf der Technologieplattform QuantiGene® 2.0 Plex Assay (ThermoFisher, Waltham, USA). Es handelt sich um einen Luminex Bead-basierten Multiplex-Assay, der aus Zelllysate eines Zervixabstrichs die Expression von bis zu 80 Biomarkern gleichzeitig qualitativ und auch quantitativ bestimmt.¹¹⁵ Dabei können neben den viralen E7-Onkogensequenzen zur HPV-Genotypisierung auch Zervixkarzinom-spezifische Biomarker gemessen werden, sodass der QG-MPH in nur einer Messung objektiv quantitative Ergebnisse von normalerweise zwei Verfahren liefern kann. Weiterhin kann durch die Messung der jeweiligen E7-Expressionsstärke der unterschiedlichen HPV-Genotypen auch eine Aussage zum dysplasieverursachenden Virustyp getroffen werden. Der QG-MPH misst ausschließlich mRNA, welche nur bei aktiven Infektionen und nicht bei HPV-Kontaminationen/Deposits gebildet wird. Diese Eigenschaft könnte helfen, zwischen transienten und transformierenden Infektionen zu unterscheiden und damit eine gute Alternative für das Screening bzw. dessen Triagierung oder sogar eine Kombination beider Schritte darstellen.¹¹⁵

In einer früheren Dissertation von P. Hannemann wurde die Labor- und Messmethodik des QG-MPH anhand einer proof-of-principle-Studie für in vitro kultivierte Zervixkarzinomzelllinien und erste klinische Proben entwickelt.¹¹⁶ Anschließend wurde der QG-MPH von N. Nevermann in einer ersten Pilotstudie erweitert sowie im klinischen Zusammenhang getestet¹¹⁷ und daraufhin von M. Basten in einer prospektiven Querschnittsstudie an einer konsekutiven Probensammlung aus einer Dysplasiesprechstunde analysiert.¹¹⁸ Bei diesen Arbeiten wurden neben HPV-Cutoffs

(Schwellenwerte) zur Bestimmung der HPV-Positivität aus den Ergebnissen der Biomarker Risikoscores (RS) für verschiedene Krankheitsschwellen entworfen, anhand derer man die HPV-Infektionen bezüglich ihrer klinischen Relevanz beurteilen und davon abhängig eine Entscheidung über weitere diagnostische und therapeutische Schritte treffen könnte. Insgesamt deuten die ersten Ergebnisse der RS darauf hin, dass der QG-MPH für die Zervixkarzinomdiagnostik eine höhere Sens. bei etwas niedrigerer Spez. als die reine Zytologie und eine deutlich höhere Spez. bei etwas niedrigerer Sens. im Vergleich zu den etablierten HPV-Tests aufweist. Im Gegensatz zum aktuellen Goldstandard der Zervixkarzinomdiagnostik, der histologischen Untersuchung (teilweise mit immunhistochemischer Färbung), scheint dem QG-MPH durch die Quantifizierung von Biomarkern eine objektive Beurteilung und nicht nur eine subjektive Aussage des Untersuchers zur Zellentartung möglich zu sein.^{117,118}

2.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, diese ersten Erkenntnisse aus der Entwicklung und Testung des QG-MPH in Bezug auf seine Anwendbarkeit im Zervixkarzinomscreening an Proben einer echten Screeningpopulation zu überprüfen. Dabei sollen insbesondere die in den Vorgängerarbeiten entwickelten HPV-Cutoffs und RS anhand klinisch erhobener Daten, Ergebnisse anderer Tests und v. a. anhand der histologischen Untersuchungsergebnisse als Screening- bzw. Triagierungsmethode validiert werden. Darüber hinaus soll mittels Follow-up-Proben dieser longitudinalen Studie die prognostische Aussagekraft des QG-MPH in Hinblick auf die Krankheitsentwicklung beurteilt werden.

2.3 Hypothesen

- Für die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik finden wir eine gute Übereinstimmung (nach Cohens Kappa (κ) und Konkordanz) mit den etablierten DNA-basierten HPV-Tests
- Mit der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik kann eine bessere Sens. als mit der Zytologie (> 50 %) erreicht werden.
- Der QG-MPH kann mithilfe von Risikoscores eine bessere Aussage bezüglich des aktuellen Krankheitsstadiums treffen als etablierte DNA-basierte HPV-Tests, die Zytologie oder das Cotesting.
- Der QG-MPH kann mithilfe von Risikoscores eine Aussage bezüglich des Entartungsrisikos machen und damit der Triagierung auffälliger Patientinnen im Screening dienen.

3 Methodik und Materialien

3.1 Studienpopulation und Probenauswahl

Für die vorliegende Arbeit wurden Proben der MARZY-Studie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Prof. Dr. med. Stefanie Klug) bereitgestellt. Im Rahmen der MARZY-Studie haben alle Probandinnen nach gründlicher Aufklärung durch den niedergelassenen Gynäkologen schriftlich in die Studienteilnahme eingewilligt. Folglich beruht auch diese Arbeit auf dem Ethikvotum der MARZY-Studie, Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz: 837.438.03 (4100). Weiterhin liegt die Unbedenklichkeit des Datenschützers Rheinland-Pfalz vor.¹¹⁹

3.1.1 Beschreibung der zugrundeliegenden MARZY-Studie

Die MARZY-Studie wurde als randomisierte populationsbasierte Kohortenstudie im aktuellen Screeningkontext zur Evaluierung der Teilnahmebereitschaft am Zervixkarzinomscreening in deutschen gynäkologischen Praxen mit verschiedenen Einladungsmodellen, zur Bestimmung der HPV-Prävalenz sowie zum Vergleich verschiedener zytologischer und HPV-Testmethoden konzipiert. Über die Einwohnermeldeämter der Stadt Mainz und des Kreises Mainz-Bingen wurden per Zufall 9.383 Frauen im Alter von 30 bis 65 ausgelost und in zwei Interventionsgruppen (mit Einladungsschreiben, mit Einladungsschreiben und zusätzlicher Broschüre) und eine Kontrollgruppe (ohne Einladung) randomisiert.¹¹⁹ Alle Frauen aus den Interventionsgruppen wurden zu einem Screening mit einem konventionellen PAP-Abstrich eingeladen. Zusätzlich wurde ein flüssigkeitsbasierter Studienabstrich genommen, aus welchem eine LBC sowie zwei HPV-Tests, der HC2 (Qiagen, Venlo, Niederlande) und das GP5+/6+ PCR Enzymimmunoassay mit anschließender Reverse Line Blot Genotypisierung (In House Test; Amsterdam UMC, VUMC, Niederlande), durchgeführt wurden. Als Ausschlusskriterien der Teilnahme galten Zustand nach Hysterektomie bzw. Zervixkarzinom sowie eine aktuelle Schwangerschaft. Insgesamt nahmen 2.627 der eingeladenen Frauen ohne Ausschlusskriterium am Baseline-Screening zwischen 2005 und 2007 teil.¹²⁰ Von diesen erschienen 2.093 zwei bis drei Jahre nach Baseline (BL) zwischen 2008 und 2012 nach erneuter Einladung zum Follow-up (FU). Hierbei wurden als Ausschlusskriterien abermals Zustand nach Hysterektomie bzw. Zervixkarzinom, eine aktuelle Schwangerschaft sowie Tod der Patientin festgelegt.

3.1.2 Substudie MABE (MARZY-Study Material Analysis for Biomarker Expression)

Aus den 2.093 Frauen wurden von Sarah Tegenfeldt, Doktorandin der MARZY-Kooperationsgruppe, alle mit in der Zytologie (LBC-Zweitmeinung \geq ASC-US), im HPV-Test (HC2 und/oder GP5+/6+ PCR Enzymimmunoassay (14 HR-HPV-Genotypen)) und/oder in der Histologie (\geq CIN1) des BL und/ oder des FU auffälligen Befunden ausgewählt. Dazu wurde von ihr eine eins-zu-eins alters-gematchte Kontrollgruppe aus den für die genannten vier Untersuchungsmethoden negativen Frauen zufällig per Computersystem gebildet. Proben mit zu wenig Restmaterial mussten dabei ausgeschlossen werden, sodass am Ende pro Gruppe 275 Patientinnen jeweils mit BL- und FU-Probe in die MABE-Studie aufgenommen werden konnten. Das Restmaterial dieser Studienabstriche wurde pseudonymisiert an das Labor für Gynäkologische Tumorummunologie der Klinik für Gynäkologie, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin gesendet.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit auch für die QG-MPH-Messung Ausschlusskriterien definiert. Diese waren ein zu geringes Actin- β -Signal von < 100 MFI (Mittlere Fluoreszenzintensität), weniger als 20 gemessene Beads pro Marker sowie ein zu hoher Messhintergrund der Probe.

Da im ersten Teil der Auswertung ausschließlich die BL-Ergebnisse im Querschnitt analysiert wurden, konnten dafür unter Berücksichtigung der Kriterien 524 von den insgesamt 550 Proben verwendet werden. Außerdem wurden für einen Teil der Querschnittsauswertungen nur die 61 Proben mit histologischem Ergebnis, dem aktuellen Goldstandard, herangezogen. Abbildung 8 zeigt eine Übersicht über die Probenauswahl für die Querschnittsanalysen dieser Arbeit.

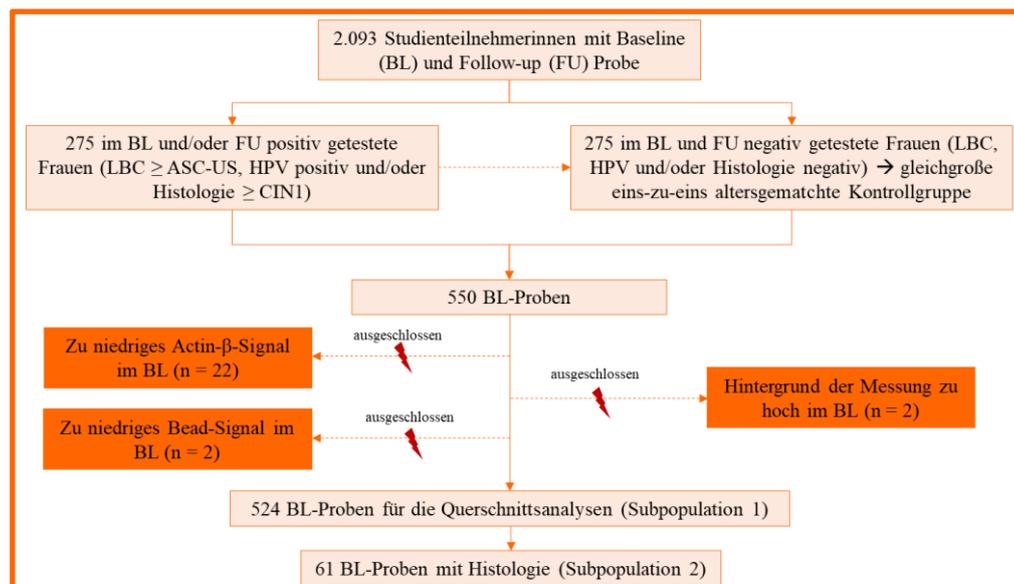


Abbildung 8: Übersicht des Ein- und Ausschlussverfahrens für die Querschnittsanalysen der Baseline-Proben. (ASC-US = Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, HPV = Humanes Papillomvirus, LBC = Liquid-Based Cytology (Zweitmeinung))

Für die longitudinalen Analysen mussten dagegen 50 Patientinnen, alle mit einer ausgeschlossenen Probe im BL oder FU aussortiert werden. Weiterhin konnte eine Patientin mit Therapie nach BL lediglich als Fallbeschreibung berücksichtigt werden, sodass für die deskriptiv-statistischen FU-Analysen 499 Patientinnen zur Verfügung standen. Die nachfolgende Abbildung 9 zeigt eine Übersicht des Ein- und Ausschlussverfahrens für diesen zweiten Teil der Auswertungen.

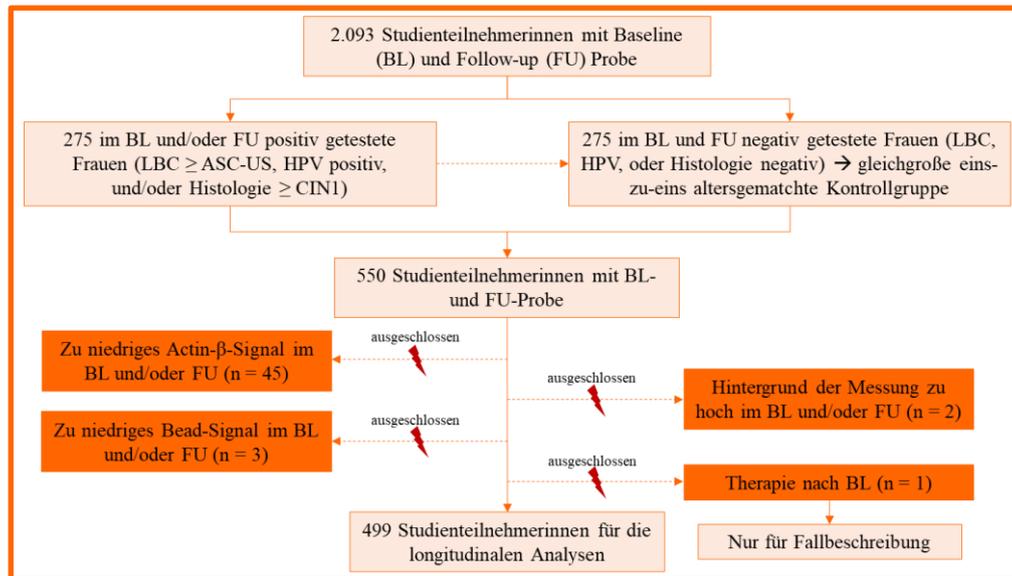


Abbildung 9: Übersicht des Ein- und Ausschlussverfahrens für die longitudinalen Analysen der Proben. (ASC-US = *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*, CIN = *Cervical Intraepithelial Neoplasia*, HPV = *Humanes Papillomvirus*, LBC = *Liquid-Based Cytology (Zweitmeinung)*)

Klinische Daten

Neben dem Restmaterial der Studienabstriche wurden für die Analysen dieser Arbeit auch die Ergebnisse der innerhalb der MARZY-Studie durchgeführten Tests/Untersuchungen bereitgestellt. Dazu zählen die des PAP-Abstrichs, der LBC Erstmeinung, des HC2, der GP5+/6+ RLB PCR (PCR), der kolposkopischen und histologischen Untersuchung sowie die mit Fragebögen abgefragten Patientenangaben bezüglich einer früheren STI-Erkrankung und einer möglicherweise durchgeführten Therapie. Die Einzelheiten über die Testverfahren in der MARZY-Studie sind bei Liang et al. veröffentlicht.¹²⁰

Probenentnahme und -lagerung

Die Proben wurden mit einem Ayre-Spatel und einer endozervikalen Bürste oder einer Zytobrush, je nach Einsicht in die Portio, aus dem Gebärmutterhals sowie ektozervikal entnommen, jeweils in 20 ml methanolhaltigem PreservCyt®-Medium (ThinPrep®, Cytoc/Hologic Inc., Marlborough, USA) fixiert und anschließend untersucht. Das übrige Material der Proben wurde seitdem bei -20 °C aufbewahrt und im Januar 2019 pseudonymisiert an das Labor für Gynäkologische

Tumorimmunologie der Klinik für Gynäkologie, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin gesendet.

3.2 QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Test

Die QG-MPH-Messmethode beruht auf der Technologieplattform QuantiGene® 2.0 Plex Assay (ThermoFisher, Waltham, USA). Im Folgenden werden die Begriffe und Benennungen aus diesem Assayprotokoll (ThermoFisher, Waltham, USA) verwendet. Die QG-MPH-Messmethode kombiniert die xMAP® (Multi-Analyte Profiling Beads) Technik und die bDNA (branched DNA) Signalamplifikation und erstreckt sich über zwei Tage. Der erste Tag dient der Lysatherstellung und einer Übernacht-Hybridisierung (18–22 Stunden) der Ziel-mRNA in der Probe mit Capture-Oligonukleotiden, die an farbkodierte magnetische Luminex Beads gekoppelt sind. In der vorliegenden Arbeit wurden 39 bzw. 40 verschiedene mRNA-Capture-Sonden für den HPV-Nachweis und die HPV-Genotypisierung sowie für die Analyse der Biomarkerexpression herangezogen. Letztere ist für spezielle Dysplasiestadien charakteristisch (s. Kapitel 1.4). Am zweiten Tag findet nicht wie bei der qRT-PCR eine Amplifizierung der Targets statt, sondern eine Signalamplifikation mittels bDNA-Technologie. Bei dieser Signalamplifikation werden Hybridisierungen mit verschiedenen Reagenzien wie Pre-Amplifier, Amplifier, Labelprobe und SAPE (Streptavidin-konjugiertes Phycoerythrin) Working Mix durchgeführt, einer ELISA- (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) typischen Färbemethode. Der SAPE Working Mix am Ende dient dabei einer Markierung der Targets mit einem Fluoreszenzfarbstoff, welcher anschließend mit dem Bio-Plex® 200 System (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) detektiert werden kann. Das System basiert auf einer Durchflusszytometrie mit zwei Lasern. Dabei unterscheidet der rote Laser die einzelnen farbkodierten Beads, wohingegen der grüne Laser für die quantitative Messung der Fluoreszenzintensität des SAPE genutzt wird. Diese wird für jeden Marker als gemittelte Fluoreszenzstärke in MFI angegeben und ist proportional zur jeweiligen mRNA-Menge in einer Probe.^{121,122}

3.2.1 Berücksichtigte Biomarker (inklusive HPV-Genotypen)

Die QG-MPH-Messungen dieser Arbeit wurden mit einer Auswahl von 39 bzw. 40 Biomarkern durchgeführt, welche in Tabelle 4 eingeteilt in ihre jeweiligen funktionellen Gruppen aufgelistet sind. Der Biomarker MMP7 wurde nur in die zweite Beadpanel-Charge aufgenommen, sodass dieser lediglich bei einem Teil der Proben gemessen werden konnte.

Tabelle 4: Einteilung der im QG-MPH-Test dieser Arbeit berücksichtigten Biomarker in ihre jeweilige funktionelle Gruppe.

Gruppeneinteilung nach Bedeutung der Biomarker	Biomarker
LR-HPV-E7	HPV 6
HR-HPV-E7	HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
Splicemarker	HPV 16 E1 ^{E4} , E1C, E6*1
Marker der zervikalen Junctionszone	KRT7, MMP7
Zelluläre Onkoproteine	BIRC5 (Survivin)
Stammzellmarker	p63, KRT17, ALDH1A1, SOX2, NANOG, POU5F1 (OCT4), TERT
Tumorsuppressoren	p53, p16
Proliferationsmarker	Stathmin, Ki67, MCM2, Topo2 α
Zellularitätsmarker	Actin- β , UBC

ALDH1A1 = Aldehyde Dehydrogenase 1 A1, E = Early Gene, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, KRT = Keratin, LR-HPV = Low-Risk-HPV, MCM = Minichromosome Maintenance, MMP7 = Matrix-Metalloproteinase 7, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology, TERT = Telomerase-Reverse-Transkriptase, TOPO2 α = Topoisomerase 2 α , UBC = Ubiquitin

3.2.2 Durchführung des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests

Lysatherstellung

Um den QG-MPH-Test durchführen zu können, war zunächst die Herstellung von Zelllysaten notwendig. Dazu wurden nach kurzem Vortexen je 2 ml der Probe in ein Eppendorf-Tube abgefüllt und für 10 Minuten bei 21.885 x g (15.000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und zum Zellpellet 100 μ l verdünnter Diluted Working Lysis Mixture zugegeben, dessen Zusammensetzung in Tabelle 5 zu sehen ist. War bei einer Probe kein Zellpellet sichtbar, wurden nur 50 μ l der Lösung hinzugegeben. Nach Vortexen, bis zur Resuspension des Zellpellets, wurde die Probe für 30 Minuten bei 50 °C und 650 rpm zur Inkubation in einen Thermoschüttler gestellt. Zeigte sich in der folgenden QG-MPH-Messung bei einer Probe eines der oben angegebenen Ausschlusskriterien, wurde diese erneut gemessen. Bei manchen wurde dafür ein neues Zelllysate, je nach Restbestand teilweise unter Verwendung von bis zu max. 4 ml Probenmaterial, hergestellt. Konnten die entstandenen Zelllysate nicht direkt verwendet werden, wurden diese bis zur Durchführung des QG-MPH bei -80 °C gelagert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Diluted Working Lysis Mixture.

Reagenz	Anteil	Lagerung
Lysis Mixture	1	Raumtemperatur, vor dem Versuch aufwärmen im Wasserbad
Proteinase K (50 μ g/ μ l)	0,01	Bei -20 °C
Ribonuklease-freies Wasser	2	Raumtemperatur

Tag 1: Hybridisierung der mRNA aus den Zelllysaten an magnetische Capture Beads

Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurden alle benötigten Lysate und Reagenzien (s. Tabelle 6) außer der Proteinase K und den Capture Beads (diese erst kurz vor Verwendung) aufgetaut bzw.

auf Raumtemperatur gebracht sowie der Lysis Mixture im Wasserbad bei 37 °C für ca. 30 Minuten vorgewärmt, der Thermoschüttler auf 54 °C eingeschaltet und eine 96-Well-Rundbodenplatte (Hybridization Plate) bereitgestellt. Von jedem aufgetauten, zu messenden Lysat wurden nach kurzem Vortexen 20 µl in jeweils ein Well pipettiert. Als Negativkontrolle (NK) wurden je 20 µl verdünnter Lysis Mixture (1/3 Lysis Mixture, 2/3 Ribonuklease-freies Wasser) in drei Wells und als Positivkontrolle (PK) ein standardisiertes Zelllinienlysat von HPV 16-positiven CaSki-Zellen in einem weiteren Well verwendet. Anschließend wurde der Working Bead Mix in der Reihenfolge entsprechend Tabelle 6 angesetzt, durch 15 Sekunden Vortexen gemischt und daraufhin von diesem in jedes Well 5 µl hinzugegeben. Dabei ist zu beachten, dass ein Entmischen des Working Bead Mix durch regelmäßiges Vortexen zu verhindern ist. Die Platte wurde nun mit einer Versiegelungsfolie (Pressure Seal) luftdicht abgedichtet und dann zur Inkubation der Proben bei 54 °C und 600 rpm für 18–22 Stunden in den Thermoschüttler gestellt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Working Bead Mix.

Reihenfolge der Zugabe	Reagenz	Lagerung	Pro Well (µl)
1	Ribonuklease-freies Wasser	Raumtemperatur	1,3
2	Lysis Mixture	Raumtemperatur	1,65
3	Blocking Reagent	-20 °C	0,5
4	Proteinase K (50 µg/µl)	-20 °C	0,05
5	Probe Set	-20 °C	1,25
6	Capture Beads	4 °C	0,25
Gesamtvolumen			5

Tag 2: Signalamplifikation und Messung

Zu Beginn des zweiten Tages wurde der Pre-Amplifier im Wärmebad bei 37 °C für ca. 30 Minuten vorgewärmt sowie die 96-Well-Platte aus dem Thermoschüttler genommen und für eine Minute bei 240 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Währenddessen wurde der Thermoschüttler auf 50 °C adjustiert und der Waschpuffer entsprechend Tabelle 7 angesetzt. Die Proben (inkl. NK/PK) wurden nach Entfernen der Folie zur Resuspension der Capture Beads ca. fünfmal auf- und abpipettiert und daraufhin auf eine Flachbodenplatte (Magnetic Separation Plate) übertragen.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Waschpuffers für eine 96-Well-Platte.

Reagenz	Pro Platte/96-Wells (ml)
Washbuffer Component 1	0,5
Washbuffer Component 2	7
Ribonuklease-freies Wasser	132,5
Gesamtvolumen	140

Nachdem die Platte auf die Magnetplatte (Hand-Held Magnetic Plate Washer) gesetzt wurde, konnte diese nach einer Minute Wartezeit zur Fixierung der magnetischen Beads am Plattenboden

zügig ausgekippt und leicht auf Papiertüchern ausgeklopft werden. Da die relevante mRNA an die magnetischen Capture Beads, die die Magnetplatte am Plattenboden fixiert, gebunden war, wurde bei diesem Vorgang lediglich überstehende Flüssigkeit entfernt. Anschließend wurde die Platte dreimal gewaschen. Hierbei wurde die Platte jeweils von der Magnetplatte genommen und nach Hinzufügen von 100 µl Waschpuffer erst für 10 Sekunden auf den Thermoschüttler und dann wieder auf die Magnetplatte gesetzt und nach einer Minute Wartezeit erneut ausgeschüttet. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Vorgangs wurden pro Well 50 µl Pre-Amplifier hinzupipettiert, dann die Platte mit einer Folie (Plate Seal) versiegelt und bei 50 °C für eine Stunde zur Hybridisierung in den Thermoschüttler gestellt. Für die ersten zwei Minuten wurde der Thermoschüttler zur Resuspension der Beads auf 800 rpm und für die restlichen 58 Minuten auf 600 rpm geschaltet.

Das im letzten Abschnitt beschriebene Prozedere wurde noch zwei weitere Male wiederholt, wobei anstelle des Pre-Amplifiers bei der ersten Wiederholung 50 µl/Well Amplifier und in der darauffolgenden 50 µl/Well Labelprobe hinzugegeben wurden. Der Amplifier und die Labelprobe müssen wie der Pre-Amplifier vor Benutzung für 30 Minuten bei 37 °C vorgewärmt werden.

Nach der letzten einstündigen Hybridisierung wurde die Platte erneut gewaschen und der SAPE Working Mix, bestehend aus 6 ml SAPE Diluent und 18 µl SAPE (für eine 96-Well-Platte), angesetzt. Wichtig hierbei ist, den SAPE erst kurz vor Gebrauch aus dem Kühlschrank zu nehmen und vor Hinzufügen zum SAPE Diluent für einige Sekunden zu vortexen und zum anschließenden Sammeln des Inhalts am Boden des Tubes eventuell kurz zu zentrifugieren. Der fertige SAPE Working Mix sollte vor weiterer Benutzung mittels Vortexen gut vermischt werden. Des Weiteren sollte die Heizung des Thermoschüttlers nach Entfernen der Platte ausgestellt und in diesen zwei Kühlakkus zum schnelleren Abkühlen gelegt werden. Nun wurden 50 µl des SAPE Working Mix in jedes Well pipettiert, die Platte daraufhin erneut versiegelt und für weitere 30 Minuten zur Bindung des SAPE bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei auch hier die Drehzahl in den ersten zwei Minuten 800 rpm und anschließend 600 rpm betrug.

Währenddessen wurde der Luminex®, das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer, sowie die Bio-Plex® Manager Software gemäß den Herstellerangaben für die Messungen vorbereitet. Dazu wurde die für die Messung benötigte Trägerflüssigkeit aufgefüllt und ein Geräte-Start-up (alternativ: „Wash between plates“) durchgeführt, wonach das bis zu 30 Minuten andauernde „Warm up“ für den Laser gestartet und das Messprotokoll erstellt werden konnte. Nach der 30-minütigen Hybridisierung wurde die Platte erneut gewaschen, diesmal allerdings mit einem SAPE Waschpuffer. Im Anschluss wurden als Messmedium 120 µl des SAPE

Waschpuffers in jedes Well gegeben und durch gründliches Auf- und Abpipettieren die Luminex Beads, an denen die signalamplifizierte spezifische mRNA gebunden war, resuspendiert. Diese konnte unter Verwendung des Luminex® mithilfe des Bio-Plex® 200 Systems gemessen und abschließend ausgewertet werden.¹²¹ Abbildung 10 veranschaulicht den Versuchsablauf von der Lyse bis hin zur Messung mit dem Luminex® bzw. Bio-Plex® 200 System.

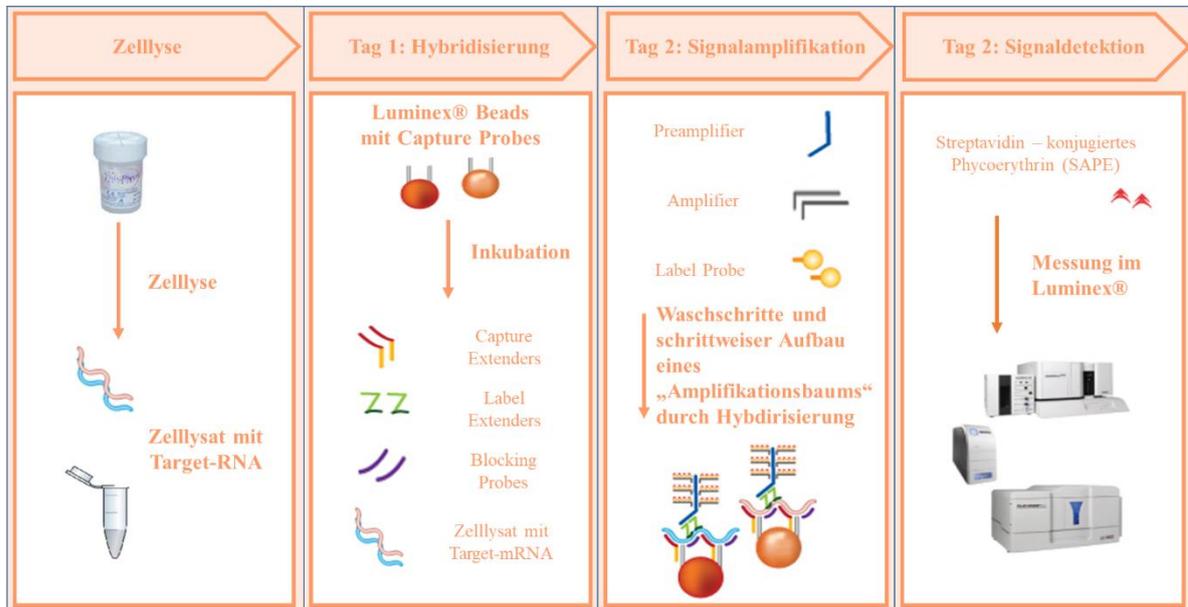


Abbildung 10: Arbeitsschritte der Zellyse und des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests. [Modifiziert nach User Manual des Herstellers, 2014¹²¹]

Die Versuchsdurchführung wurde teilweise abweichend von den Herstellerangaben durchgeführt, was in den Arbeiten von P. Hannemann, N. Nevermann und M. Basten keine Veränderung der Messqualität zur Folge hatte. Zu diesen Abweichungen zählten aus Gründen der Kosteneffizienz die Herunterskalierung der Lysatmenge und des Working Beadmix auf ein Viertel, die Reduktion der Färbereagenzien Pre-Amplifier, Amplifiers, Labelporbe und SAPE auf die Hälfte sowie das Ablösen der Flachbodenplatte von der Magnetplatte und deren kurzes Schütteln während des Waschvorgangs zu dessen verbesserter Effizienz durch Verhinderung der Beadaggregation und -akkumulation am Boden der Platte. Weiterhin wurde zur Beschleunigung der Messung das Messvolumen im Luminex® Reader auf 90 µl gesetzt.¹¹⁶⁻¹¹⁸

3.2.3 Verwendete Materialien und Geräte

Die nachfolgenden Tabellen stellen alle verwendeten Reagenzien (Tabelle 8), Verbrauchsmaterialien und Geräte (Tabelle 9) dar.

Tabelle 8: Verwendete Reagenzien während der Lyse und des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests.

Reagenz	Hersteller
QuantiGene® 2.0 Sample Processing Kit, blood samples	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
Lysis Mixture	
Proteinase K (50 µg/µl)	
QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology Kit	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
Proteinase K (50 µg/µl)	
Blocking Reagent	
Label Probe	
Pre-Amplifier	
Amplifier	
Streptavidin-konjugiertes Phycoerythrin (SAPE)	
SAPE Diluent	
Lysis Mixture	
Washbuffer Component 1	
Washbuffer Component 2	
SAPE Washbuffer	
Capture Beadplex und Probe Set (kundenspezifisch)	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
Ribonuklease-freies Wasser Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Sheath Fluid	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte.

Verbrauchsmaterial/Gerät	Name	Hersteller
Reaktionsgefäß	Tube 2 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	Falcon® Tube 15 ml, 50 ml	Corning Inc. (Corning, USA)
Serologische Pipetten	Falcon® Pipet 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Inc. (Corning, USA)
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips 0,5–20 µl, 2–100 µl, 100–1000 µl	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc. (Bohemia, USA)
Pipettierhilfe	Glassmaster	Ranin Instruments Co, Inc. (Columbus, USA)
Eppendorf Pipetten	Research plus® 0,5–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Multikanalpipetten	Research plus® 0,5–10 µl, 10–1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge	Biofuge primo R (Rotor: Heraeus 7500 7593 24 x 2 ml)	Heraeus/ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Wasserbad	TW 12	Julabo GmbH (Seelbach, Deutschland)
Thermoschüttler für 96-Well-Platte	PHMP	Grant Instruments Ltd. (Shepreth, UK)
Thermoschüttler 2-ml-Tubes	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Platten-Zentrifuge	Heraeus Multifuge 1 _{S-R} (Rotor 7500 2010)	Heraeus/ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Magnetplatte	Hand-Held Magnetic Plate Washer	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
Luminex®-Reader	Bio-Plex® 200 System	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
96-Well-Platten	Magnetic Separation Plate	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
	Hybridization Plate	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
Versiegelungsfolie	Plate Seals	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
	Pressure Seals	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
Kühl- und Eisschränke	4 °C	Liebherr (Bulle, Schweiz)
	-20 °C	Liebherr (Bulle, Schweiz)
	-80 °C	Heraeus/ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

3.2.4 Auswertungsvorgehen

Für die Auswertung der Messungen müssen HPV-Cutoffs, die Formel zur Relativierung und Normalisierung der gemessenen Biomarker sowie die Berechnungen der RS und daraus folgend der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik definiert werden.

HR-HPV-Cutoffs für die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik

Um eine Probe als HR-HPV-positiv bzw. -negativ einstufen zu können, müssen zunächst die quantitativen Ergebnisse der einzelnen HR-HPV-Genotypen mittels Cutoffs dichotomisiert werden. Diese wurden in der Arbeit von M. Basten mithilfe von ROC-Analysen (Receiver Operating Characteristic) basierend auf den Ergebnissen des Multiplex Genotyping Assays (GP5+/6+ Luminex®) ermittelt.¹¹⁸ Tabelle 10 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Cutoffs.

Tabelle 10: Verwendete HR-HPV-Cutoffs mit Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu den Ergebnissen des Multiplex Genotypings. [Modifiziert nach Basten, 2019¹¹⁸]

HR-HPV-Genotyp	Klinischer Cutoff (MFI)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
16	32,25	65,8	97,1
18	54,75	78,7	95,3
26	59,50	100,0	99,9
31	31,75	81,7	95,0
33	28,25	65,6	91,0
35	33,75	84,0	99,6
39	28,75	66,1	95,2
45	64,75	61,0	93,2
51	38,75	54,7	99,3
52	27,75	59,8	96,8
53	26,75	59,7	93,0
56	29,25	60,3	98,7
58	25,25	84,4	97,1
59	26,75	64,7	92,1
66	40,75	33,3	96,5
68	23,75	79,2	78,7
73	55,50	80,0	99,6
82	31,25	66,7	99,0

HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität

Relativierung der Biomarker

Der erste Schritt zur Relativierung der Biomarker ist in jeder Messung der Abzug des aus den NK berechneten Signalhintergrunds in MFI (Mittelwert der NK) von den Rohwerten in MFI. Um einen auf die Zellzahl relativierten Wert der Biomarker zu erhalten, wird anschließend das Zwischenergebnis auf das Haushaltsgen Actin- β , bei dem zuvor auch der Signalhintergrund abgezogen wurde, normiert (Division durch MFI-Wert von Actin- β der jeweiligen Probe). Für eine bessere Veranschaulichung der Werte werden die Ergebnisse mit dem Faktor 100 multipliziert.

Die nachfolgende Formel 1, die in der Arbeit von N. Nevermann zuerst genutzt wurde, fasst diese Schritte zur Errechnung der relativierten MFI (rMFI) noch einmal zusammen.¹¹⁷ Abweichend zu N. Nevermann konnten in dieser Arbeit bei einigen Messungen aufgrund zu starker Signalhintergrundabweichungen nur zwei NK verwendet werden. Nach der Relativierung der Biomarker wurden alle negativen rMFI-Werte auf 0 gesetzt.

Formel 1: Formel zur Relativierung der Biomarker. [Modifiziert nach Nevermann, 2019¹¹⁷]

$$rMFI = \frac{\text{gemessener Rohwert Biomarker (MFI)} - \text{Mittelwert der Negativkontrollen Biomarker (MFI)}}{\text{gemessener Rohwert Actin-}\beta \text{ (MFI)} - \text{Mittelwert der Negativkontrollen Actin-}\beta \text{ (MFI)}} * 100$$

MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität, rMFI = Relativierte mittlere Fluoreszenzintensität

Berechnung der Risikoscores und der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik

Zur Bestimmung der QG-MPH Dysplasie-Diagnose und somit des Stadiums einer zervikalen Dysplasie, wurden die RS, die in der Dissertation von M. Basten für drei definierte Krankheitsschwellen entwickelt wurden, verwendet. Als weiterer Biomarker diente der in ihrer Arbeit eingeführte „führende HPV“. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit leicht abweichend von M. Basten der höchste Wert aller relativierten HR-HPV-Ergebnisse herangezogen, auch wenn die Probe anhand der Rohwerte als HR-HPV-negativ dichotomisiert wurde.

Der RS CIN2+ dient der Zuordnung (Dichotomisierung) einer Probe in eine der zwei Kategorien, histologisch normal (unauffällig) oder CIN1 einerseits und CIN2 oder höher andererseits. Dieser wurde von M. Basten anhand der fünf Biomarker, die in ihrer Dissertation bei der multivariaten logistischen Regression in Kombination die beste Vorhersagekraft für diese Krankheitsschwelle zeigten, entwickelt.¹¹⁸ Dazu wurden zuvor von ihr die relativierten Biomarkerwerte anhand der durch ROC-Analysen berechneten für diese Krankheitsschwelle besten Cutoffs nach Youden-Index dichotomisiert. Bei Überschreitung des jeweiligen Cutoffs wurde im RS ein von ihr berechneter Regressionskoeffizient b mit 1 multipliziert, ansonsten mit 0. Die Formel wurde von M. Basten durch eine berechnete Konstante a ergänzt. Die genaue Berechnung des RS CIN2+ sowie die hierfür benutzten Biomarker mit ihren jeweiligen Cutoffs zeigt Formel 2.

Formel 2: Formel zur Berechnung des Risikoscores CIN2+. [Modifiziert nach Basten, 2019¹¹⁸]

$$p(\text{CIN2+}) = \frac{1}{1 + e^{-(-1,430 + 1,364 * x_1 + 0,718 * x_2 + 0,612 * x_3 + 0,928 * x_4 + 0,413 * x_5)}}$$

$x_1 = 0$ bzw. 1, wenn führender HPV	< bzw. >	1,34 rMFI
$x_2 = 0$ bzw. 1, wenn HPV16 E6*I	< bzw. >	1,17 rMFI
$x_3 = 0$ bzw. 1, wenn HPV16 E1^E4	< bzw. >	1,00 rMFI
$x_4 = 0$ bzw. 1, wenn p16	< bzw. >	6,47 rMFI
$x_5 = 0$ bzw. 1, wenn Stathmin	< bzw. >	17,33 rMFI

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, E = Early Gene, HPV = Humanes Papillomvirus, rMFI = Relativierte mittlere Fluoreszenzintensität

Zur weiteren Auswertung wurden die RS CIN2+-Ergebnisse nun mithilfe des durch erneute ROC-Analyse von M. Basten ermittelten besten Cutoffs nach Youden-Index dichotomisiert (positiv/negativ). Dieser Cutoff liegt für den RS CIN2+ mit einer Sens. von 73,4 % und einer Spez. von 78,0 % bei $p \geq 0,51$.¹¹⁸ In der Arbeit von M. Basten wurden dieselben Berechnungen zur Entwicklung der RS für die Krankheitsschwellen zur CIN3+, welche eine Probe einer der zwei Kategorien, histologisch normal, CIN1 oder CIN2 einerseits und CIN3 oder Karzinom andererseits zuweisen soll, sowie für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom (CxCa), durchgeführt. Letzterer soll der Zuordnung in eine der zwei Kategorien, Karzinom oder alle niedrigeren histologischen Stadien, dienen. Die jeweils notwendigen Biomarker mit Cutoffs sowie die genauen Berechnungen dieser RS sind in den Formeln 3 und 4 zu sehen, wobei die Cutoffs für den RS CIN3+ bei $p \geq 0,19$ (Sens. 82,4 %, Spez. 63,3 %) und für den RS CxCa bei $p \geq 0,02$ (Sens. 90 %, Spez. 79,9 %) liegen.¹¹⁸

Formel 3: Formel zur Berechnung des Risikoscores CIN3+. [Modifiziert nach Basten, 2019¹¹⁸]

$$p(\text{CIN3+}) = \frac{1}{1 + e^{-(-2,396 + 0,697 * x_1 + 0,736 * x_2 + 0,794 * x_3 + 1,097 * x_4 + 0,582 * x_5)}}$$

$x_1 = 0$ bzw. 1, wenn HPV16 E6*I	< bzw. >	1,34 rMFI
$x_2 = 0$ bzw. 1, wenn HPV16 E1^E4	< bzw. >	1,05 rMFI
$x_3 = 0$ bzw. 1, wenn führender HPV	< bzw. >	1,40 rMFI
$x_4 = 0$ bzw. 1, wenn p16	< bzw. >	11,10 rMFI
$x_5 = 0$ bzw. 1, wenn MCM2	< bzw. >	5,19 rMFI

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, E = Early Gene, HPV = Humanes Papillomvirus, MCM = Minichromosome Maintenance, rMFI = Relativierte mittlere Fluoreszenzintensität,

Formel 4: Formel zur Berechnung des Risikoscores CxCa. [Modifiziert nach Basten, 2019¹¹⁸]

$$p(\text{CxCa}) = \frac{1}{1 + e^{-(-6,563 + 1,391 * x_1 + 1,227 * x_2 + 1,444 * x_3 + 1,166 * x_4 + 1,142 * x_5)}}$$

$x_1 = 0$ bzw. 1, wenn MCM2	< bzw. >	7,96 rMFI
$x_2 = 0$ bzw. 1, wenn BIRC5	< bzw. >	1,52 rMFI
$x_3 = 0$ bzw. 1, wenn ALDH1A1	< bzw. >	2,99 rMFI
$x_4 = 0$ bzw. 1, wenn TERT	< bzw. >	0,49 rMFI
$x_5 = 0$ bzw. 1, wenn führender HPV	< bzw. >	13,43 rMFI

ALDH1A1 = Aldehyde Dehydrogenase 1 A1, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, E = Early Gene, HPV = Humanes Papillomvirus, MCM = Minichromosome Maintenance, rMFI = Relativierte mittlere Fluoreszenzintensität, TERT = Telomerase-Reverse Transkriptase

Aus der Zusammenschau der drei dichotomisierten RS-Ergebnisse lassen sich nun QG-MPH Dysplasie-Diagnosen bilden. Dabei gilt eine Patientin als QG-MPH CIN2+, wenn sie positiv im RS CIN2+ und/oder RS CIN3+ und/oder RS CxCa eingestuft wurde. Analog dazu wird die Diagnose QG-MPH CIN3+ bei einem positiven Ergebnis im RS CIN3+ und/oder RS CxCa gestellt sowie die Diagnose QG-MPH CxCa, wenn die Patientin im RS CxCa über dem Cutoff liegt.

3.2.5 Beadmix-Validierung

Da die MARZY-Proben zunächst mit einem 39- und später mit einem neuen 40-Plex Beadmix gemessen wurden, die RS aber mit einem 46-Plex Beadmix (46 Biomarker) entwickelt wurden, mussten erstere vor Verwendung in einer Beadmix-Validierung (39- vs. 46-Plex Beadmix) bzw. in einer Chargenvalidierung (40- vs. 39-Plex Beadmix, s. Kapitel 3.2.6) geprüft werden. Hierfür wurden zunächst die kultivierten Zervixkarzinomzelllinien HeLa und CaSki in den Konzentrationen 30.000 und 300 Zellen pro 20 µl sowie sechs Konzentrationen (500 ng, 125 ng, 31,3 ng, 7,8 ng, 2 ng und 0,5 ng) der humanen Referenz-RNA (hURR) pro 20 µl mit dem 46-Plex Beadmix (alter Beadmix) und dem 39-Plex Beadmix (neuer Beadmix) gemessen und dann die Werte der jeweils entsprechenden Proben verglichen. Der Grund für die Reduktion des Beadmix auf 39 bzw. 40 Biomarker war das Weglassen von nicht aussagekräftigen Biomarkern.

Bei der Auswertung wurden einerseits die Variationskoeffizienten (Standardabweichung geteilt durch Mittelwert) für die Rohwerte der 18 HR-HPV-Genotypen, die zur Bestimmung der HR-HPV-Positivität herangenommen wurden, und andererseits die Variationskoeffizienten der in die RS eingehenden relativierten Biomarker (führender HPV, HPV16 E6*I, HPV16 E1^E4, p16, Stathmin, MCM2, BIRC5, TERT, ALDH1A1) betrachtet. Um möglicherweise irreführend hohe Variationskoeffizienten bei den relativierten Werten zu vermeiden, wurden für deren Berechnungen sowohl in der Beadmix-Validierung als auch in der Chargenvalidierung (s. Kapitel 3.2.6) und der Test-Retest-Reliabilität (s. Kapitel 3.2.7) alle rMFI < 0,1 auf 0 gesetzt. Ohne diesen Schritt würde man beispielsweise bei einem relativierten Wert von 0,03 mit dem alten Beadmix und 0,01 mit dem neuen Beadmix einen Variationskoeffizienten von 50 % erhalten, obwohl die absolute Abweichung irrelevant klein ist.

Der Variationskoeffizient liegt unter Einschluss der Rohwerte der 18 HR-HPV-Genotypen im Durchschnitt bei ca. 21 %. Für die in die RS eingehenden relativierten Biomarker wurde ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von ca. 24 % verzeichnet, wobei im Durchschnitt TERT mit 54 % die größte und HPV16 E1^E4 mit 5 % die geringste Abweichung aufweist, wie auch in den nachfolgenden Tabellen 11A und B zu sehen ist.

Tabelle 11: Variationskoeffizienten der relativierten Biomarkermessergebnisse zwischen altem und neuem Beadmix. A) HPV16 E1^{E4}. B) TERT.

A		HPV16 E1 ^{E4}				
		neuer Beadmix (rMFI)	alter Beadmix (rMFI)	Standardabweichung	Mittelwert	Variationskoeffizient
hURR	500 ng	0,00	0,00	0,00	0,00	0 %
	125 ng	0,00	0,00	0,00	0,00	0 %
	31,3 ng	0,00	0,00	0,00	0,00	0 %
	7,8 ng	0,00	0,00	0,00	0,00	0 %
	2 ng	0,00	0,00	0,00	0,00	0 %
	0,5 ng	0,00	0,00	0,00	0,00	0 %
					Mittelwert	0 %
HeLa	30.000 Zellen	0,00*	0,00*			0 %
	300 Zellen	0,00	0,00			0 %
					Mittelwert	0 %
CaSki	30.000 Zellen	6,24*	10,19*	1,97	8,22	24 %
	300 Zellen	6,67	10,65	1,99	8,66	23 %
					Mittelwert	24 %
					Mittelwert	5 %

B		TERT				
		neuer Beadmix (rMFI)	alter Beadmix (rMFI)	Standardabweichung	Mittelwert	Variationskoeffizient
hURR	500 ng	0,60	0,64	0,02	0,62	3 %
	125 ng	0,19	0,33	0,07	0,26	27 %
	31,3 ng	0,13	0,25	0,06	0,19	30 %
	7,8 ng	0,00	0,25	0,13	0,13	100 %
	2 ng	0,00	0,26	0,13	0,13	100 %
	0,5 ng	0,00	0,60	0,30	0,30	100 %
					Mittelwert	60 %
HeLa	30.000 Zellen	0,15*	0,18*	0,01	0,17	8 %
	300 Zellen	0,00	0,21	0,11	0,11	100 %
					Mittelwert	54 %
CaSki	30.000 Zellen	0,00*	0,00*	0,00	0,00	0 %
	300 Zellen	0,16	1,00	0,42	0,58	72 %
					Mittelwert	36 %
					Mittelwert	54 %

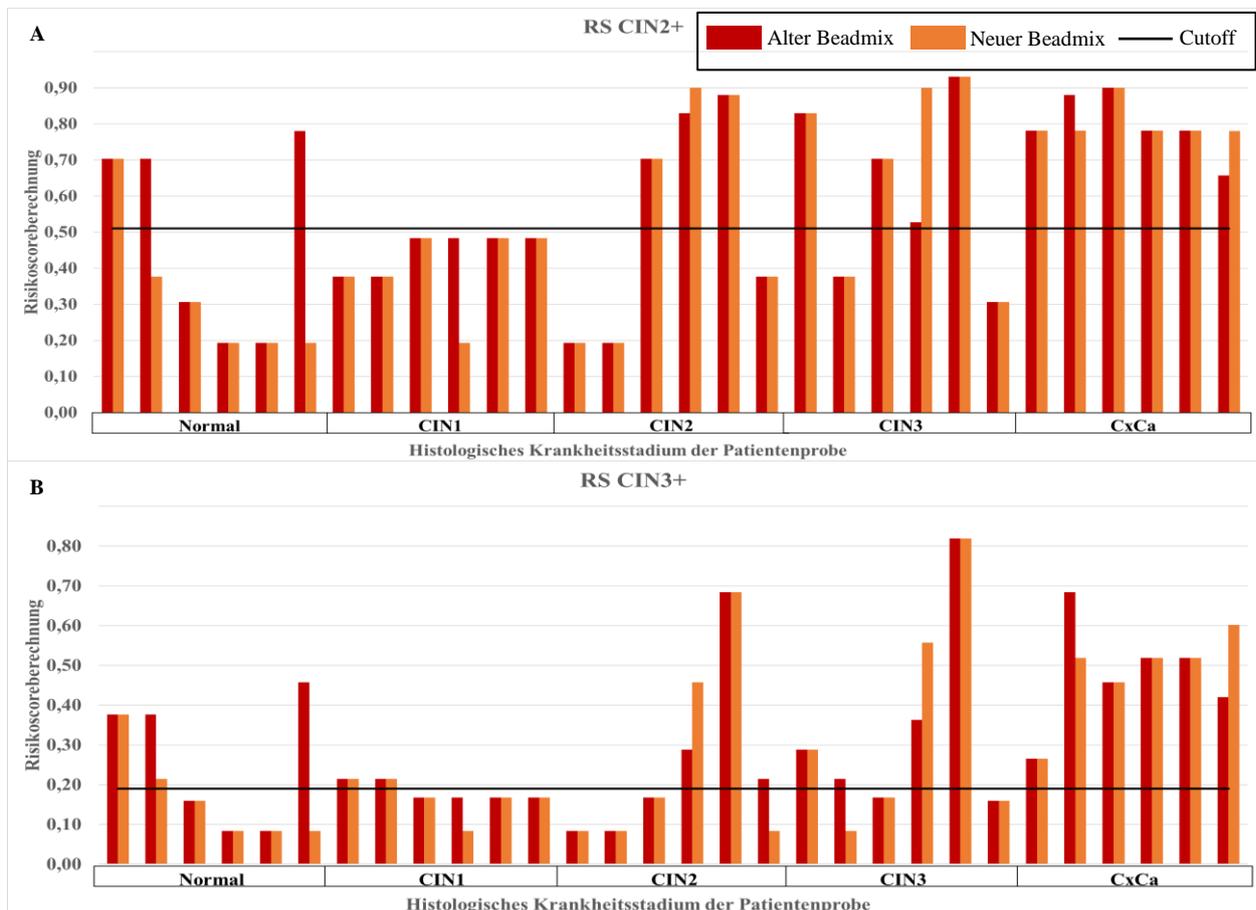
*Die obere Grenze des dynamischen Messbereichs des Luminex liegt bei ca. 25.000 Zellen, jedoch für jeden Biomarker unterschiedlich hoch.

HPV = Humanes Papillomvirus, hURR = Humane Referenz-RNA, rMFI = Relativierte mittlere Fluoreszenzintensität, TERT = Telomerase-Reverse-Transkriptase

Auch wenn beim Marker TERT die Variationskoeffizienten bedingt durch sehr niedrige relativierte Messwerte hoch erscheinen, sind die absoluten Abweichungen dieser Werte dennoch so gering, dass meistens die Werte des alten und des neuen Beadmix oberhalb oder beide Werte unterhalb des Cutoffs (> 0,49) liegen. Die Durchschnittsvariationskoeffizienten von ca. 21 % bzw. 24 % befinden sich etwas über der von uns angestrebten Maximalabweichung (bis ca. 20 %).

Im zweiten Teil der Beadmix-Validierung wurden 30 Proben, die von M. Basten mit dem 46-Plex Beadmix gemessen wurden, mit dem neuen 39-Plex Beadmix erneut untersucht. Dabei wurden

aus ihrem Probenkollektiv jeweils sechs Proben pro histologischer Gruppe (Normal, CIN1, CIN2, CIN3, Karzinom) gewählt und deren mit dem neuen Beadmix gemessenen Ergebnisse mit den Daten von M. Basten verglichen. Bezüglich der Auswertung der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik aus den Rohdaten mittels Cutoffs (die Betrachtung von 18 HR-HPV Genotypen bei 30 Proben ergibt eine Gesamtzahl von 540 Messergebnissen) zeigt sich eine Übereinstimmung von 98 % (529/540), während die Auswertung der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik 83 % (25/30) Übereinstimmung aufweist. Die nachfolgende Abbildung 11 veranschaulicht die RS-Ergebnisse der beiden Messungen. Beim Vergleich der mit dem alten und der mit dem neuen Beadmix gemessenen Ergebnisse kam es beim RS CIN2+ bei zwei Proben (7 %), beim RS CIN3+ bei drei Proben (10 %) und beim RS CxCa bei zwei Proben (7 %) zu relevanten Abweichungen in der Auswertung. Insgesamt erreichen die beiden Beadmixe mit den genannten Übereinstimmungen von 98 % und 83 % weitestgehend vergleichbare Ergebnisse.



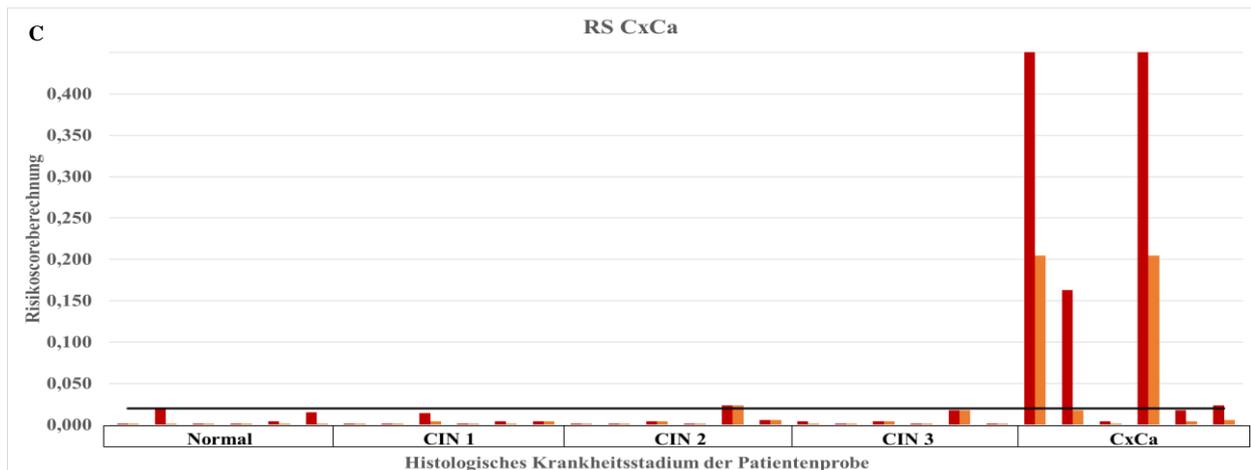


Abbildung 11: Auswertung und Vergleich der Messungen mit dem alten und dem neuen Beadmix anhand der Risikoscoreberechnungen bei sechs verschiedenen Patientinnen pro histologischer Gruppe (Normal, CIN1, CIN2, CIN3 und CxCa). **A)** RS CIN2+. **B)** RS CIN3+. **C)** RS CxCa. (Alter Beadmix (rot), neuer Beadmix (gelb), Cutoff (schwarze Linie), Probe positiv (Balken oberhalb des Cutoffs), Probe negativ (Balken unterhalb des Cutoffs), CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CxCa = Cervical Cancer, RS = Risikoscore)

3.2.6 Chargenvalidierung

Für die Messung der 1.100 MARZY-Proben wurden zwei verschiedene Chargen (39- und 40-Plex Beadmix) verwendet, welche in einer Chargenvalidierung gegenübergestellt werden. Die zweite Charge enthält einen zusätzlichen Biomarker MMP7, der bereits im Kapitel 3.2.1 ausführlich beschrieben wurde. Bei der Validierung wurden wie bei der Beadmix-Validierung im vorigen Kapitel erneut zwei Konzentrationen der kultivierten Zervixkarzinomzelllinien HeLa und CaSki sowie sechs Verdünnungskonzentrationen von hURR verwendet (s. Kapitel 3.2.5).

Der durchschnittliche Variationskoeffizient liegt für die Rohwerte der 18 HR-HPV-Genotypen bei ca. 14 % und für die in die RS eingehenden relativierten Biomarker bei ca. 15 %. TERT ist dabei mit ca. 42 % erneut der Biomarker mit der größten durchschnittlichen Abweichung. Der Marker mit den stabilsten Werten ist hier allerdings Stathmin mit durchschnittlich 5 % Abweichung.

Auch hier wurden im zweiten Teil der Validierung 30 MARZY-Proben, die mit der 39-Plex Charge bereits ausgewertet wurden, erneut mit der 40-Plex Charge gemessen und die Ergebnisse gegenübergestellt. Beim Vergleich der Auswertung der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik aus den Rohwerten mittels Cutoffs wurde eine Übereinstimmung von 100 % konstatiert, darunter ein positiver Fall. Bezüglich der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik zeigt sich eine Übereinstimmung von ca. 93 % (28/30). Dabei wurden in den RS CIN2+ und CIN3+ keine Abweichungen verzeichnet, lediglich beim RS CxCa wurde zwischen den beiden Messungen für 2 von 30 Patientinnen (ca. 7 %) ein unterschiedliches Ergebnis vermerkt. Tabelle 12 zeigt den Vergleich der QG-MPH Dysplasie-Diagnosen.

Tabelle 12: Vergleich der QG-MPH Dysplasie-Diagnosen der 39- und 40-Plex Charge.

Patientin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
39-Plex Charge	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	0	0	0	0	0
40-Plex Charge	3	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0

Patientin	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
39-Plex Charge	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40-Plex Charge	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abweichende Resultate orange markiert, 0 = Normal, 1 = QG-MPH CIN2+, 2 = QG-MPH CIN3+, 3 = QG-MPH CxCa, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CxCa = Cervical Cancer, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology

Aus den PK der einzelnen Messungen konnte für jeden Marker jeweils ein Mittelwert für die 39-Plex bzw. 40-Plex Charge ermittelt und diese gegenübergestellt werden. Zwischen den beiden Gruppen zeigt sich für die Rohwerte der 18 HR-HPV-Genotypen ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von ca. 11 % und für die in den RS eingehenden relativierten Biomarker von ca. 2 %. Die Zusammenschau dieser drei Teile der Chargenvalidierung legt vergleichbare Ergebnisse der beiden Chargen nahe.

3.2.7 Test-Retest-Reliabilität

Für eine initiale Beurteilung bezüglich der Test-Retest-Reliabilität wurden acht MARZY-Proben zweimal mit der 40-Plex Charge hybridisiert und gemessen. Der durchschnittliche Variationskoeffizient für die Rohwerte der 18 HR-HPV-Genotypen liegt bei ca. 10 %, wobei die anschließende Auswertung der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik aus den Rohwerten mittels Cutoffs (die Betrachtung von 18 HR-HPV Genotypen bei acht Proben ergibt eine Gesamtzahl von 144 Messergebnissen) eine Übereinstimmung von ca. 99 % (143 von 144) zeigt. Darunter waren in der ersten Messung drei Proben HR-HPV positiv, wovon in der zweiten Messung zwei erneut positiv dichotomisiert wurden (66,66 %). Bei der in der ersten Messung knapp über dem Cutoff liegenden HR-HPV positiven Probe, die in der zweiten Messung HR-HPV negativ dichotomisiert wurde, wurde in letzterer zwar ein erhöhtes Signal gemessen, dieses lag jedoch noch unter dem Cutoff. Für die neun relativierten Biomarker, die in die RS eingehen, beträgt der Variationskoeffizient ca. 17 %. Die Übereinstimmung der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik liegt bei 100 % (8/8). Insgesamt kann somit von einer guten Test-Retest-Reliabilität ausgegangen werden.

3.3 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Statistikern und Mitarbeitern der MARZY-Studie in München durchgeführt. Es wurden dafür die Programme Excel® 2016

(Microsoft® Corporation, Redmond, USA) und R® Version 4.0.3¹²³ verwendet. Im Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin wurde das analytische Vorgehen anschließend hinsichtlich der angewandten Methoden überprüft und als adäquat befunden.

Deskriptive Statistik

Zur Beschreibung der Studienpopulationen der Querschnittsanalysen wurden für das Alter, die klinischen Untersuchungsergebnisse (LBC, PAP, HC2, PCR, Kolposkopie, Histologie) sowie die Angaben in den Fragebögen zur Therapie und zu STI-Erkrankungen der Patientinnen die absoluten und relativen Häufigkeiten bestimmt. Dies wurde auch für die QG-MPH HR-HPV-Ergebnisse und die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik sowie für die Beschreibung der deskriptiven prognostischen FU-Ergebnisse vorgenommen. Für letztere wurden zusätzlich 95 % Konfidenzintervalle (KI) berechnet.

Konkordanz und Cohens Kappa

Um das Vermögen der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik zu bewerten, wurde zuerst die Konkordanz (p_0) zwischen den HR-HPV-Ergebnissen des QG-MPH und denen bereits etablierter DNA-basierter HPV-Tests ermittelt. Da eine große Anzahl negativer Ergebnisse zu einer hohen Anzahl zufälliger Übereinstimmungen führt und somit die errechnete Konkordanz positiv verfälschen kann, wurde weiterhin eine Analyse nach Cohens Kappa (κ) mit zugehörigem 95 % KI mithilfe des R Package „psych“¹²⁴ durchgeführt. Cohens Kappa korrigiert das Ergebnis um den Anteil zufälliger Übereinstimmungen und besitzt somit eine höhere Aussagekraft. Die Auswertung der κ -Ergebnisse erfolgte nach der Einteilung von Landis und Koch folgendermaßen: „schlecht/poor“ ($\kappa < 0$), „gering/slight“ ($\kappa = 0-0,2$), „mittelmäßig/fair“ ($\kappa = 0,21-0,4$), „moderat/moderate“ ($\kappa = 0,41-0,6$), „beachtlich/substantial“ ($\kappa = 0,61-0,8$) und „fast perfekt/almost perfect“ ($\kappa = 0,81-1$).¹²⁵ Die Berechnungen dieser beiden Methoden werden in den Formeln 5 und 6 veranschaulicht.

Formel 5: Formel zur Berechnung der Konkordanz (p_0) bei einer Gesamtzahl (n).

$$p_0 = \frac{\sum \text{Übereinstimmungen}}{n}$$

Formel 6: Formel zur Berechnung von Cohens Kappa (κ) und der zufälligen Übereinstimmungen (p_e) bei einer Gesamtzahl (n).

$$\kappa = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$$

$$p_e = \left(\frac{\text{Methode1 positiv}}{n} * \frac{\text{Methode2 positiv}}{n} \right) + \left(\frac{\text{Methode1 negativ}}{n} * \frac{\text{Methode2 negativ}}{n} \right)$$

$p_0 = \text{Konkordanz}$

Sensitivität, Spezifität und Likelihood Ratio

Um die Qualität der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik und QG-MPH Dysplasie-Diagnostik zu bestimmen, wurden in dieser Arbeit die Sens. und Spez. sowohl für diese als auch für die Untersuchungsmethoden der MARZY-Studie errechnet. Da die Histologie den Goldstandard zur Diagnostik des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen darstellt, wurde sie als Referenzmethode herangezogen. Als Endpunkte dieser und nachfolgender Berechnungen wurden die histologischen Diagnosen CIN2+ und CIN3+ gewählt. Zunächst wurden die rohen Sens. und Spez. wie in Formel 7 und 8 veranschaulicht und die zugehörigen 95 % KI mithilfe des Packages „epiR“¹²⁶ berechnet.

Formel 7: Formel zur Berechnung der Sensitivität.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtig als krank erkannte Frauen}}{\text{alle erkrankten Frauen}}$$

Formel 8: Formel zur Berechnung der Spezifität.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtig als gesund erkannte Frauen}}{\text{alle gesunden Frauen}}$$

Um darüber hinaus auch den klinischen Nutzen der Methode zu eruieren, wurden Likelihood Ratios (LR) mit zugehörigen 95 % KI bestimmt. Dabei gibt die positive LR (LR^+) das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung zur Wahrscheinlichkeit keiner Erkrankung im Falle eines positiven Testergebnisses an. Die negative LR (LR^-) dagegen stellt das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit krank zu sein gegenüber der Wahrscheinlichkeit gesund zu sein bei einem negativen Testergebnis dar. Auch für diese Analysen wurde das R Package „epiR“¹²⁶ verwendet. Die Formeln 9 und 10 zeigen die Berechnungswege und Tabelle 13 die Bewertung der LR-Ergebnisse hierfür.

Formel 9: Formel zur Berechnung der positiven Likelihood Ratio (LR^+).

$$LR^+ = \frac{\text{Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses bei erkrankten Personen}}{\text{Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses bei gesunden Personen}}$$

gleichbedeutend:

$$LR^+ = \frac{\text{Sensitivität}}{1 - \text{Spezifität}}$$

Formel 10: Formel zur Berechnung der negativen Likelihood Ratio (LR^-).

$$LR^- = \frac{\text{Wahrscheinlichkeit eines negativen Testergebnisses bei erkrankten Personen}}{\text{Wahrscheinlichkeit eines negativen Testergebnisses bei gesunden Personen}}$$

gleichbedeutend:

$$LR^- = \frac{1 - \text{Sensitivität}}{\text{Spezifität}}$$

Tabelle 13: Bewertung der Ergebnisse der Likelihood Ratio (LR). [Modifiziert nach Schwarzer et al., 2002¹²⁷]

LR^+	LR^-	Interpretation
> 10	< 0,1	Überzeugende diagnostische Evidenz
5 - 10	0,1 - 0,2	Hohe diagnostische Evidenz
2 - 5	0,2 - 0,5	Schwache diagnostische Evidenz
1 - 2	0,5 - 1	Kaum relevante diagnostische Evidenz

Darüber hinaus wurde eine adjustierte Variante der Sens., Spez., LR^+ und LR^- ermittelt, die den sogenannten Verifikationsbias herausfiltert. Dieser beruht in der MARZY-Studie im Wesentlichen darauf, dass neben den Screening-positiven Frauen nur 5 % per Zufallssystem gewählte Screening-negative Frauen zur Kolposkopie eingeladen wurden, und dass von diesen wiederum nicht alle der Einladung gefolgt sind bzw. eine histologische Untersuchung erhalten haben. Zur Berechnung der adjustierten Variante wurden die Teilnehmerinnen ausgehend von ihrem Screeningergebnis in drei Gruppen eingeteilt:

- Stratum 1: Zytologie (PAP und LBC) und HC2 negativ
- Stratum 2: Zytologie (PAP und LBC) negativ und HC2 positiv
- Stratum 3: Zytologie (PAP und/oder LBC) positiv unabhängig vom HC2-Ergebnis

Für jedes Stratum wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass eine beliebige Frau des jeweiligen Stratums zur Gruppe der histologisch Untersuchten zählt. Anschließend wurden die Wahrscheinlichkeiten der Strata invertiert als Gewichtung zur Berechnung der adjustierten Sens., Spez., LR^+ und LR^- benutzt. Das zugehörige 95 % KI wurde über Bootstrap-Stichproben mithilfe des Packages „boot“^{128,129} berechnet.

Die relative Sens. bzw. Spez. gibt das Verhältnis der absoluten Sens. bzw. Spez. zweier zu vergleichender Methoden an. Bei einem Wert > 1, wäre diejenige Methode, die als Dividend eingesetzt wurde, als besser zu werten und bei einem Wert < 1 diejenige Methode, die als Divisor eingesetzt wurde. Das zugehörige 95 % KI gibt die Signifikanz des Ergebnisses an. Sobald dieses den Wert 1 nicht beinhaltet, gilt das Ergebnis als signifikant, während ein Resultat mit Inklusion des Werts 1 als nicht signifikant gewertet werden muss. Dargestellt werden die Ergebnisse der relativen Sens. und Spez. in dieser Arbeit mithilfe des Packages „forestplot“¹³⁰.

4 Ergebnisse

Zu Beginn der Ergebnisauswertung werden mithilfe der deskriptiven Statistik in Kapitel 4.1 die für die Querschnittsanalysen ausgewählten Studienteilnehmerinnen der MARZY-Studienpopulation bezüglich klinischer Daten und der Ergebnisse der in der MARZY-Studie durchgeführten Testverfahren sowie bezüglich der Resultate der QG-MPH HR-HPV- und QG-MPH Dysplasie-Diagnostik beschrieben. In Kapitel 4.2 wird die Übereinstimmung der QG-MPH HR-HPV-Ergebnisse mit den Resultaten zweier bereits etablierter DNA-basierter HPV-Testverfahren anhand der Berechnungen von Konkordanz und Cohens Kappa (κ) analysiert. Basierend auf den Befunden des Goldstandards Histologie werden anschließend die absoluten Sens. und Spez. der QG-MPH HR-HPV- und QG-MPH Dysplasie-Diagnostik und der in der MARZY-Studie durchgeführten Screeningmethoden in Kapitel 4.3 dargestellt. Zum besseren Vergleich des QG-MPH-Tests mit den anderen Screeningmethoden werden nachfolgend die relativen Sens. und Spez. für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ berechnet. Schließlich wird mit den zugehörigen FU-Befunden der Teilnehmerinnen die prognostische Aussagekraft des QG-MPH-Tests anhand deskriptiver Statistik und Fallbeschreibungen geprüft (Kapitel 4.4).

4.1 Deskriptive Statistik klinischer Daten und Baseline-Ergebnisse

Für die Analysen in Kapitel 4.2 und 4.3 wurden ausschließlich die klinischen Daten und BL-Ergebnisse der für die Querschnittsanalysen eingeschlossenen 524 Teilnehmerinnen (s. Kapitel 3.1.2) herangezogen. Mit allen 524 (Subpopulation 1) wurden die Übereinstimmungsanalysen der HR-HPV-Ergebnisse (4.2) vorgenommen. In den Sens.- und Spez.-Analysen (4.3) hingegen konnten ausschließlich die BL-Ergebnisse der 61 Frauen berücksichtigt werden, die im BL der MARZY-Studie eine histologische Untersuchung erhalten hatten (Subpopulation 2). Aus diesem Grund werden nachfolgend beide Studienpopulation vorgestellt.

4.1.1 Studienpopulation mit validem QG-MPH-Ergebnis im Baseline (Subpopulation 1)

Von den 524 Teilnehmerinnen, die für die HR-HPV-Übereinstimmungsanalysen (4.2) herangezogen wurden, waren 36,26 % zwischen 30 und 39, 35,11 % zwischen 40 und 49 und 28,63 % über 49 Jahre alt.

In der MARZY-Studie wurden die zytologischen Untersuchungen LBC und PAP anhand der Münchner Nomenklatur II bewertet. Für die Einstufung der Ergebnisse in die Kategorien

unauffällig (negativ) einerseits und pathologisch (positiv) andererseits wurde aus Gründen der Kompatibilität zur MARZY-Studie für beide Untersuchungen der Cutoff \geq PAP IIw benutzt. Wenn nicht anders angegeben, gilt dieser für alle Auswertungen dieser Arbeit. Die LBC, für welche in allen Auswertungen die Ergebnisse der Erstbegutachtung herangezogen wurden, ergab für 509 Patientinnen (97,14 %) den Befund PAP I oder II und für 15 Frauen (2,86 %) ein Ergebnis \geq PAP IIw. Demgegenüber zeigt sich in der PAP-Untersuchung bei 488 Frauen (93,13 %) der Befund PAP I oder II und bei 17 Teilnehmerinnen (3,24 %) ein Ergebnis \geq PAP IIw. Für 19 Frauen ist kein PAP-Ergebnis im BL verfügbar.

In den Analysen dieser Arbeit beruhen die Ergebnisse der PCR auf denen der GP5+/6+ RLB PCR. Mit der PCR konnten 92 (17,56 %), mit dem HC2 81 (15,46 %) HR-HPV-positive Befunde detektiert werden. Damit liegen die Ergebnisse der beiden etablierten DNA-basierten HPV-Tests in dieser Subpopulation etwas über der angenommenen Prävalenz der deutschen Bevölkerung. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit der im Rahmen dieser Fall-Kontroll-Studie durchgeführten Selektion der Proben (s. Kapitel 3.1.2) zuzuschreiben.

154 der 524 in die Querschnittsanalysen inkludierten Frauen wurden weiterführend zu einer Kolposkopie eingeladen. Dabei handelt es sich um alle Frauen mit einem pathologischen Befund in der Zytologie, dem PAP und/oder der LBC (Erstbegutachtung), und/oder einem positiven Ergebnis im HC2. Zudem wurden 5 % per Zufall gewählte, zytologisch unauffällige und HC2-negativ getestete Studienteilnehmerinnen eingeladen. Da die PCR erst post hoc durchgeführt wurde, hatten deren Ergebnisse keinen Einfluss auf die Einladungen zur Kolposkopie. Der Einladung sind 93 Frauen gefolgt, wobei bei 61 Patientinnen auch eine Biopsie entnommen wurde und folglich ein histologisches Ergebnis vorliegt.

Bei der FU-Untersuchung wurden die Patientinnen gebeten, einen Fragebogen u. a. zu den Themen Therapie und STI (Kondylome, Infektionen mit Chlamydien und Herpes) auszufüllen. Es handelt sich hierbei jedoch ausschließlich um subjektive Patientenangaben und um eine generelle Frage einer jemals aufgetretenen STI-Erkrankung ohne zeitliche oder qualitative Eingrenzung. Daraus resultiert eine nur eingeschränkte Aussagekraft bezüglich einer möglichen Beeinflussung der Testergebnisse durch eine STI. Tabelle 14 stellt den Ausschnitt der Studienpopulation für die Querschnittsanalysen im Detail vor.

Ergebnisse

Tabelle 14: Beschreibung der Subpopulation 1 (n = 524) anhand klinischer Daten und der Baseline-Ergebnisse der MARZY-Studie.

	n	%
Alter (Jahre)		
30 - 39	190	36,26
40 - 49	184	35,11
50 - 59	106	20,23
60+	44	8,40
LBC (Liquid-Based Cytology)		
I	4	0,76
II	505	96,37
I/II	0	0,00
IIw	0	0,00
IIk	5	0,95
III	0	0,00
III D	9	1,72
IVa	1	0,19
IVb	0	0,00
V	0	0,00
Fehlend	0	0,00
PAP (Konventionelle Zytologie)		
I	27	5,15
II	392	74,81
I/II	69	13,17
IIw	10	1,91
IIk	0	0,00
III	0	0,00
III D	6	1,15
IVa	1	0,19
IVb	0	0,00
V	0	0,00
Fehlend	19	3,63
HC2 HR-HPV*		
Positiv	81	15,46
Negativ	443	84,54
Fehlend	0	0,00

	n	%
PCR HR-HPV**		
Positiv	92	17,56
Negativ	432	82,44
Fehlend	0	0,00
Histologie		
Normal	50	9,54
CIN1	2	0,38
CIN2	3	0,57
CIN3	6	1,15
Kein Ergebnis	463	88,36
Kolposkopie		
Ja	93	17,75
Nein (eingeladen, nicht gekommen)	61	11,64
Kein Ergebnis (nicht eingeladen)	370	70,61
Therapie		
Ja	2	0,38
Nein (keine Therapie/ keine Angabe)	522	99,62
Kondylome***		
Jemals	33	6,30
Nie	424	80,92
Fehlend	67	12,79
Infektion mit Chlamydien***		
Jemals	22	4,20
Nie	396	75,57
Fehlend	106	20,23
Infektion mit Herpes***		
Jemals	15	2,86
Nie	432	82,44
Fehlend	77	14,69
Gesamt	524	100,00

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, PCR = GP5+/6+ RLB PCR

* Für den HC2 wurden 13 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) einbezogen

** Für die PCR wurden 14 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) einbezogen

*** Informationen nur von Fragebögen im FU verfügbar

Insgesamt wurden mittels PCR mehr HR-HPV-positive Befunde (92) diagnostiziert als mittels HC2 (81). Im Vergleich dazu wurden im QG-MPH lediglich 21 Frauen als HR-HPV-positiv eingestuft, wobei sich unter diesen eine Frau mit einer multiplen Infektion mit mehreren HR-HPV-Genotypen befand. Dabei wurden in der PCR 14, im HC2 13 und im QG-MPH 18 HR-HPV-Genotypen berücksichtigt. Bei allen drei Methoden sind die 13 von der WHO als High-Risk definierten HR-HPV-Genotypen eingeschlossen. Analysiert man nur diese 13 WHO HR-HPV-Genotypen, liefert die PCR 88 positive Fälle und der QG-MPH 20. Gliedert man die positiven Fälle der im jeweiligen Test standardmäßig gemessenen HR-HPV-Genotypen anhand der HPV

Ergebnisse

Risikogruppeneinteilung auf, wurden bei der PCR 78,26 % und beim QG-MPH 66,67 % der High HR-HPV (hHR) Gruppe, die aus den potentiell gefährlichsten HPV-Genotypen 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58 besteht, zugeordnet. Sowohl in der PCR mit 41,30 % als auch im QG-MPH mit 23,81 % ist HPV 16 der mit Abstand am häufigsten gemessene Genotyp, wie aus Tabelle 15 zu entnehmen ist.

Tabelle 15: Vergleich der HR-HPV-Ergebnisse der PCR der MARZY-Studie mit denen der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik für die Gesamtpositivität, die Risikogruppen (High-HR, Medium-HR und Potential-HR) und die einzelnen Genotypen in Subpopulation 1.

	PCR		QG-MPH	
	n	%	n	%
Gesamtzahl der Frauen	524	100,0	524	100,0
Anzahl der HR-HPV-negativen Frauen*	432	82,44	503	95,99
Anzahl der HR-HPV-positiven Frauen*	92	17,56	21	4,01
Anzahl der HR-HPV-negativen Frauen nach 13 WHO HR-HPV-Genotypen**)	436	83,21	504	96,18
Anzahl der HR-HPV-positiven Frauen nach 13WHO HR-HPV-Genotypen**)	88	16,79	20	3,82
Anzahl der HR-HPV-positiven Frauen*	92	100,0	21	100,0
Einzelinfektion	77	83,70	20	95,24
Multiple Infektion	15	16,30	1	4,76
High-Risk-Gruppe positiv***				
High-HR (16, 18, 31, 33, 45, 52, 58)	72	78,26	14	66,67
Medium-HR (35, 39, 51, 56, 59, 66, 68)	33	35,87	8	38,10
Potential-HR (73, 82)****	1	1,09	0	0,00
High-Risk-Typen positiv***				
HPV 16	38	41,30	5	23,81
HPV 18	7	7,61	2	9,52
HPV 26	---	---	0	0,00
HPV 31	8	8,70	2	9,52
HPV 33	5	5,43	0	0,00
HPV 35	3	3,26	0	0,00
HPV 39	4	4,35	1	4,76
HPV 45	6	6,52	0	0,00
HPV 51	2	2,17	1	4,76
HPV 52	13	14,13	2	9,52
HPV 53	---	---	0	0,00
HPV 56	16	17,39	2	9,52
HPV 58	1	1,09	3	14,29
HPV 59	1	1,09	2	9,52
HPV 66	11	11,96	2	9,52
HPV 68	1	1,09	1	4,76
HPV 73	0	0,00	0	0,00
HPV 82	1	1,09	0	0,00

HPV = Humanes Papillomvirus, HR = High-Risk, HR-HPV = High-Risk-HPV, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology HR-HPV-Diagnostik, WHO = World Health Organization
 * Für die PCR wurden 14 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) und für den QG-MPH 18 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) einbezogen
 ** WHO HR-HPV-Genotypen: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
 *** Infektionen mit multiplen Typen möglich
 **** HPV 26 und 53 wurde nicht in der PCR gemessen und daher zum besseren Vergleich der Tests aus der Gruppenanalyse ausgenommen
 --- dieses Typen wurden nicht in die PCR Messung eingeschlossen

Tabelle 16 vergleicht die QG-MPH Dysplasie-Diagnosen (Formeln s. Kapitel 3.2.4) mit den Ergebnissen der Zytologie, wobei die PAP- und LBC-Untersuchungen sowohl getrennt als auch kombiniert betrachtet werden. Auf die zytologischen Untersuchungen wurde der oben definierte Cutoff angewendet. 52,94 % der 17 PAP-positiven Frauen wurden im QG-MPH CIN2+ positiv befundet, während 79,92 % der 488 PAP-negativen Teilnehmerinnen auch QG-MPH CIN2+-negativ waren. Somit zeigt sich beim Vergleich zwischen PAP und QG-MPH CIN2+-Diagnostik eine Gesamtübereinstimmung der positiven (9 Übereinstimmungen) und negativen (390 Übereinstimmungen) Ergebnisse von 79,00 % (insgesamt 505 Vergleiche). Es muss dabei allerdings vermerkt werden, dass 98 Frauen QG-MPH CIN2+-positiv bewertet wurden, die in der PAP-Untersuchung ein Ergebnis kleiner PAP IIw (negativ) hatten.

Während 79,37 % der 509 LBC-negativen Frauen auch als QG-MPH CIN2+-negativ eingestuft wurden, sind 46,67 % der 15 Teilnehmerinnen mit pathologischem LBC-Ergebnis auch QG-MPH CIN2+-positiv. Dementsprechend zeigt sich zwischen LBC und QG-MPH CIN2+-Diagnostik eine Übereinstimmung von 78,44 %.

Werden nun diese beiden zytologischen Testverfahren kombiniert und eine Patientin als positiv gewertet, sobald eine der beiden zytologischen Untersuchungen über dem Cutoff liegt, so zeigen 80,21 % der 480 zytologisch negativen Frauen auch in der QG-MPH CIN2+-Diagnostik ein negatives Ergebnis. Von den 27 zytologisch auffälligen Frauen wurden 44,44 % auch in der QG-MPH CIN2+-Diagnostik als positiv erkannt. Dies ergibt eine Gesamtübereinstimmung an positiven (12 Übereinstimmungen) und negativen (385 Übereinstimmungen) Ergebnissen von 78,30 %.

Insgesamt wurden 112 Frauen QG-MPH CIN2+- und 110 Frauen darüber hinaus auch QG-MPH CIN3+-positiv getestet. Der Vergleich der Ergebnisse von QG-MPH CIN3+ vs. Zytologie zeigt eine nahezu identische Übereinstimmung wie der oben beschriebene Vergleich zwischen QG-MPH CIN2+ vs. Zytologie. Als QG-MPH CxCa-positiv wurden dagegen insgesamt 25 Patientinnen bewertet. Dass die Zahl der QG-MPH CxCa-Diagnosen unter den zytologisch auffällig befundenen Frauen gering ausfällt, erscheint logisch, wenn man berücksichtigt, dass bei der regelmäßig durchgeführten Zytologie häufig bereits die Vorstufen und nicht erst das Karzinom erkannt werden.

Ergebnisse

Tabelle 16: Vergleich der Ergebnisse der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik mit denen der zytologischen Untersuchungen der MARZY-Studie in Subpopulation 1.

	PAP n=505				LBC n=524				PAP und/oder LBC n=507				Gesamt	
	Pos.	%	Neg.	%	Pos.	%	Neg.	%	Pos.	%	Neg.	%	n	%
Zytologie	17	3,37	488	96,63	15	2,86	509	97,14	27	5,33	480	94,67	524	100,00
Gesamt	17	100,00	488	100,00	15	100,00	509	100,00	27	100,00	480	100,00		
QG-MPH CIN2+ (RS CIN2+ und/oder RS CIN3+ und/oder RS CxCa pos.)														
Pos.	9	52,94	98	20,08	7	46,67	105	20,63	12	44,44	95	19,79	112	21,37
Neg.	8	47,06	390	79,92	8	53,33	404	79,37	15	55,56	385	80,21	412	78,63
QG-MPH CIN3+ (RS CIN3+ und/oder RS CxCa pos.)														
Pos.	9	52,94	96	19,67	7	46,67	103	20,24	12	44,44	93	19,38	110	20,99
Neg.	8	47,06	392	80,33	8	53,33	406	79,76	15	55,56	387	80,63	414	79,01
QG-MPH CxCa (RS CxCa)														
Pos.	2	11,76	23	4,71	1	6,67	24	4,72	3	11,11	22	4,58	25	4,77
Neg.	15	88,24	465	95,29	14	93,33	485	95,28	24	88,89	458	95,42	499	95,23

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CxCa = Cervical Cancer, LBC = Liquid-Based Cytology, Neg. = Negativ, Pos. = Positiv, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology, RS = Risikoscore

In Tabelle 17 wird darüber hinaus ein Vergleich der HR-HPV-Ergebnisse der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik mit denen der PCR dargestellt. Dabei waren 19,6 % der PCR-positiven Frauen auch in der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik positiv, während 99,3 % der PCR-negativen auch im QG-MPH ein negatives Ergebnis zeigten, sodass sich eine Gesamtübereinstimmung von 85,3 % ergibt. Die Gegenüberstellung der PCR und der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik wird in Tabelle 17 außerdem unterteilt in die verschiedenen HR-HPV Gruppen (hHR, mHR, potHR) abgebildet.

Tabelle 17: Vergleich der HR-HPV-Ergebnisse der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik und der der PCR.

	PCR*				Gesamt	
	Positiv	%	Negativ	%	n	%
Gesamtzahl der Frauen	92	17,6	432	82,4	524	100,0
	92	100,0	432	100,0	524	100,0
Anzahl der QG-MPH HR-HPV-negative Frauen**	74	80,4	429	99,3	503	96,0
Anzahl der QG-MPH HR-HPV-positiven Frauen**	18	19,6	3	0,7	21	4,0
High-Risk Gruppe positiv***						
High-HR (16, 18, 31, 33, 45, 52, 58)	Positiv	13	14,1	1	0,2	2,7
	Negativ	79	85,9	431	99,8	97,3
Medium-HR (35, 39, 51, 56, 59, 66, 68)	Positiv	6	6,5	2	0,5	1,5
	Negativ	86	93,5	430	99,5	98,5
Potential-HR (73, 82)	Positiv	0	0,0	0	0,0	0,0
	Negativ	92	100,0	432	100,0	100,0

HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology

* Für die PCR wurden 14 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) einbezogen (PCR = GP5+/6+ RLB PCR)

** Für den QG-MPH wurden 18 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) einbezogen

*** Infektionen mit multiplen Typen möglich

4.1.2 Studienpopulation mit histologischem Ergebnis im Baseline (Subpopulation 2)

Für die Analyse der Sens. und Spez. der QG-MPH HR-HPV- bzw. QG-MPH Dysplasie-Diagnostik konnten lediglich die BL-Ergebnisse der 61 Patientinnen mit vorhandener Histologie im BL, welche als Referenzmethode gilt, herangezogen werden. Diese Frauen werden in Tabelle 18 entsprechend ihrer jeweiligen histologischen Diagnose, Normal (50 Patientinnen), CIN1 (zwei Patientinnen), CIN2 (drei Patientinnen) und CIN3 (sechs Patientinnen), unterteilt und bezüglich Alter, Zytologie-Ergebnissen, HR-HPV-Resultaten (inklusive QG-MPH HR-HPV-Diagnostik), Therapie und STI-Erkrankungen beschrieben.

Von den insgesamt sechs Patientinnen der Gruppe CIN3 wurden in der LBC lediglich zwei (33,33 %) als pathologisch eingestuft, von den 3 Patientinnen aus Gruppe CIN2 keine. Da in der Gruppe Normal 44 der 50 Frauen ein unauffälliges LBC-Ergebnis zeigen, wurde somit bei sechs Frauen (12,00 %) unter Zugrundelegung des Goldstandards ein falsch positiver Befund erhoben. Gemäß den histologischen Resultaten wurde in der PAP-Untersuchung unter den histologisch als normal eingestuften Frauen zu 18,00 % ein falsch positiver Befund sowie in der Gruppe CIN2 und CIN3 zu 66,67 % ein falsch negativer Befund verzeichnet.

Der HC2 zeigt bei 60,00 % der in der Histologie als normal eingestuften Frauen ein positives HR-HPV-Testergebnis, was, wie in der Einleitung bereits erwähnt, möglicherweise auf die Detektion transienter Infektionen zurückzuführen ist. Demgegenüber konnte für den HC2 in der Gruppe CIN2 eine Detektionsrate von 100,00 % erreicht werden und auch in der Gruppe CIN3 wurde nur eine Patientin nicht HC2-positiv getestet. Mittels PCR wurde in der Gruppe CIN3 ebenfalls nur eine Teilnehmerin mit negativem HR-HPV-Ergebnis vermerkt. Unter den CIN2-Patientinnen erkannte die PCR allerdings zwei der drei HC2-positiven Frauen nicht. Die Rate positiv detektierter Frauen unter den histologisch Unauffälligen liegt dafür in der PCR mit 34,00 % deutlich niedriger als im HC2. Die Analyse der einzelnen HR-HPV-Gruppen offenbart, dass in der Gruppe CIN3 vier der fünf PCR-positiven Frauen eine Infektion mit einem HR-HPV-Genotyp der hHR-Gruppe hatten.

Die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik verzeichnet im Vergleich zu den anderen beiden DNA-basierten HPV-Tests insgesamt deutlich weniger HR-HPV-Infektionen (QG-MPH 12 vs. PCR 23 vs. HC2 39). So detektierte der QG-MPH-Test eine von drei Frauen aus der Gruppe CIN2 und 4 von 6 aus der Gruppe CIN3, wobei alle QG-MPH HR-HPV-positiven Fälle (100,00 %) der hHR-Gruppe zugeordnet wurden. Mit 14,00 % ist allerdings auch die Rate der durch die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik falsch positiv Getesteten erheblich niedriger.

Ergebnisse

Beim Vergleich der histologischen Resultate mit den Ergebnissen der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik mittels Biomarkerexpression ist zu vermerken, dass von neun Frauen der histologischen Gruppe CIN2+ (CIN2 und CIN3) sechs und damit 66,67 % auch mittels QG-MPH als CIN2+ eingestuft wurden. Frauen mit einem histologischen Normalbefund bzw. CIN1 wurden zu 82,00 % bzw. 100,00 % auch im QG-MPH-Test als unauffällig bzw. kleiner CIN2 befundet. Ähnliche Ergebnisse wurden für die QG-MPH CIN3+-Diagnostik verzeichnet, die bei 83,33 % der histologischen CIN3+ (CIN3) Erkrankungen ebenfalls ein positives Ergebnis konstatieren konnte. Bezüglich der QG-MPH CxCa-Diagnostik kann gesagt werden, dass 95,08 % der Frauen mit einem histologischen Normalbefund sowie einer CIN1-, CIN2- oder CIN3-Erkrankung auch im QG-MPH-Test als negativ hinsichtlich des Risikos einer Karzinomerkrankung klassifiziert wurden. Einen genauen Überblick über diese Auswertungen verschafft Tabelle 19.

Ergebnisse

Tabelle 18: Beschreibung der Subpopulation 2 (n = 61) anhand klinischer Daten und Baseline-Ergebnisse der MARZY-Studie, eingeteilt in die jeweilige histologische Gruppe (Normal, CIN1, CIN2, CIN3).

	Normal		CIN1		CIN2		CIN3		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
	50	81,97	2	3,28	3	4,92	6	9,84	61	100,00
Alter (Jahre)										
30-39	16	32,00	0	0,00	1	33,33	3	50,00	20	32,79
40-49	18	36,00	1	50,00	1	33,33	1	16,67	21	34,43
50-59	7	14,00	0	0,00	1	33,33	1	16,67	9	14,75
60+	9	18,00	1	50,00	0	0,00	1	16,67	11	18,03
LBC (Liquid-Based Cytology)										
Positiv (IIw+)	6	12,00	0	0,00	0	0,00	2	33,33	8	13,11
Negativ	44	88,00	2	100,00	3	100,00	4	66,67	53	86,89
Fehlend	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
PAP (Konventionelle Zytologie)										
Positiv (IIw+)	9	18,00	1	50,00	1	33,33	2	33,33	13	21,31
Negativ	39	78,00	1	50,00	2	66,67	4	66,67	46	75,41
Fehlend	2	4,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	3,28
HC2 HR-HPV* (Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test)										
Positiv	30	60,00	1	50,00	3	100,00	5	83,33	39	63,93
Negativ	20	40,00	1	50,00	0	0,00	1	16,67	22	36,07
PCR HR-HPV** (GP5+/6+ RLB PCR)										
Positiv	17	34,00	0	0,00	1	33,33	5	83,33	23	37,70
High-HR	14	82,35	0	0,00	1	100,00	4	80,00	19	82,61
Medium-HR	6	35,29	0	0,00	0	0,00	1	20,00	7	30,43
Potential-HR	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Negativ	33	66,00	2	100,00	2	66,67	1	16,67	38	62,30
QG-MPH HR-HPV*** (QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology)										
Positiv	7	14,00	0	0,00	1	33,33	4	66,67	12	19,67
High-HR	3	42,86	0	0,00	1	100,00	4	100,00	8	66,67
Medium-HR	5	71,43	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	41,67
Potential-HR	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Negativ	43	86,00	2	100,00	2	66,67	2	33,33	49	80,33
Therapie										
Ja	1	2,00	0	0,00	0	0,00	1	16,67	2	3,28
Nein	49	98,00	2	100,00	3	100,00	5	83,33	59	96,72
Kondylome****										
Jemals	6	12,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	9,84
Nie	36	72,00	2	100,00	2	66,67	4	66,67	44	72,13
Fehlend	8	16,00	0	0,00	1	33,33	2	33,33	11	18,03
Infektion mit Chlamydien****										
Jemals	4	8,00	0	0,00	0	0,00	1	16,67	5	8,20
Nie	33	66,00	2	100,00	2	66,67	2	33,33	39	63,93
Fehlend	13	26,00	0	0,00	1	33,33	3	50,00	17	27,87
Infektion mit Herpes****										
Jemals	2	4,00	0	0,00	0	0,00	1	16,67	3	4,92
Nie	38	76,00	2	100,00	2	66,67	4	66,67	46	75,41
Fehlend	10	20,00	0	0,00	1	33,33	1	16,67	12	19,67

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, HPV = Humanes Papillomvirus, HR = High-Risk, HR-HPV = High-Risk-HPV

* 13 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) einbezogen

** 14 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) einbezogen

*** 18 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) einbezogen

**** Informationen nur vom FU verfügbar

Tabelle 19: Vergleich der Ergebnisse der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik mit denen der histologischen Untersuchung der MARZY-Studie in Subpopulation 2.

	Normal		CIN1		CIN2		CIN3		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
	50	81,97	2	3,28	3	4,92	6	9,84	61	100,00
QG-MPH CIN2+ (RS CIN2+ und/oder RS CIN3+ und/oder RS CxCa positiv)										
Positiv	9	18,00	0	0,00	1	33,33	5	83,33	15	24,59
Negativ	41	82,00	2	100,00	2	66,67	1	16,67	46	75,41
QG-MPH CIN3+ (RS CIN3+ und/oder RS CxCa positiv)										
Positiv	9	18,00	0	0,00	1	33,33	5	83,33	15	24,59
Negativ	41	82,00	2	100,00	2	66,67	1	16,67	46	75,41
QG-MPH CxCa (RS CxCa positiv)										
Positiv	1	2,00	0	0,00	1	33,33	1	16,67	3	4,92
Negativ	49	98,00	2	100,00	2	66,67	5	83,33	58	95,08

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CxCa = Cervical Cancer, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology, RS = Risikoscore

4.2 HR-HPV-Diagnostik mittels QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Test

Um die Treffsicherheit der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik beurteilen zu können, wurde ihre Übereinstimmung mit bereits etablierten, DNA-basierten HPV-Tests (PCR und HC2) auf der Basis von Konkordanz und Cohens Kappa (κ) Analysen (s. Tabelle 20) ermittelt. Letztere wurden, wie in der Methodik bereits beschrieben, nach Landis und Koch durchgeführt.¹²⁵

Beim Vergleich von QG-MPH HR-HPV-Diagnostik und der PCR zeigt sich unter Einbeziehung aller vom jeweiligen Test berücksichtigten HR-HPV-Genotypen (QG-MPH HR-HPV-Diagnostik: 18, PCR: 14) eine Konkordanz von 85,31 % und ein mittelmäßiges κ von 0,27. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt die Gegenüberstellung von QG-MPH HR-HPV-Diagnostik (18 Typen) und HC2 (13 Typen). Die Übereinstimmung der PCR und des HC2 fällt mit einer Konkordanz von 79,58 % und einem mittelmäßigem κ von 0,26 etwas niedriger aus. Um die Vergleichbarkeit der Methoden zu erhöhen, wurden bei einer erneuten Analyse für alle drei HR-HPV-Tests lediglich die 13 von der WHO als „High-Risk“ definierten Genotypen herangezogen. Dies ergab jedoch nur unwesentliche Unterschiede zu den oben genannten Ergebnissen.

Da der HC2 nur global angibt, ob eine Probe HR-HPV-positiv ist, ohne den HR-HPV-Genotyp zu bestimmen, können mit diesem Test lediglich die Gesamtauswertungen verglichen werden. Bei der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik und der PCR können darüber hinaus auch die einzelnen HR-HPV-Genotypen und -Gruppen betrachtet werden. Zwischen diesen beiden Tests zeigt sich für die Genotypen 51 und 59 mit einer Konkordanz von 99,81 % und einem κ von 0,67 sowie für den Genotyp 18 mit einer Konkordanz von 99,05 % und einem moderaten κ von 0,44 eine gute

Ergebnisse

Übereinstimmung. Für die Genotypen 33, 35, 45, 73, 82 und somit auch für die Gruppe potHR (73 und 82) kann kein κ ermittelt werden, da hier lediglich in einem der beiden Tests ein positiver Fall auftrat. Ihre Konkordanz liegt dabei jeweils bei $> 90,00\%$. Für die Genotypen 58 und 68 dagegen liegt keine Übereinstimmung der positiven Ergebnisse vor, sodass sich hier ein κ von 0 ergibt, obwohl für die Konkordanz aufgrund der großen Übereinstimmung an negativen Ergebnissen Werte von $99,24\%$ bzw. $99,62\%$ erzielt werden. Die weiteren Ergebnisse der hHR- und mHR-Gruppe sowie der Typen 16, 31, 39, 52, 56 und 66 liegen im Bereich der Gesamtübereinstimmung.

Tabelle 20: Übereinstimmungsanalyse der HR-HPV-Ergebnisse der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik, der PCR und des HC2 mittels Berechnungen von Konkordanz (K) und Cohens Kappa (κ) in Subpopulation 1.

	QG-MPH vs. PCR			QG-MPH vs. HC2			PCR vs. HC2		
	524			524			524		
Gesamtpositivität	K (%)	κ	KI 95 %	K (%)	κ	KI 95 %	K (%)	κ	KI 95 %
HR-HPV-positiv*	85,31	0,27	0,17–0,38	87,02	0,29	0,17–0,40	79,58	0,26	0,16–0,36
HR-HPV-positiv nach WHO**	85,88	0,27	0,16–0,38	86,83	0,27	0,16–0,39	80,34	0,27	0,17–0,38
High-Risk-Gruppen									
hHR (16, 18, 31, 33, 45, 52, 58)	88,55	0,27	0,15–0,39						
mHR (35, 39, 51, 56, 59, 66, 68)	94,47	0,27	0,10–0,45						
potHR (73, 82)	99,81	----	----						
High-Risk-Genotypen									
16	93,70	0,22	0,06–0,38						
18	99,05	0,44	0,04–0,85						
31	98,85	0,40	0,01–0,78						
33	99,05	----	----						
35	99,43	----	----						
39	99,43	0,40	-0,14–0,94						
45	98,85	----	----						
51	99,81	0,67	0,05–1,00						
52	97,90	0,26	-0,03–0,55						
56	97,33	0,22	-0,04–0,47						
58	99,24	0,00	-0,01–0,00						
59	99,81	0,67	0,05–1,00						
66	98,28	0,30	-0,02–0,63						
68	99,62	0,00	0,00–0,00						
73	100,00	----	----						
82	99,81	----	----						

HC2 = Digene Hybrid Capture 2 High-Risk-HPV-DNA-Tests, hHR = High-HR, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, mHR = Medium-HR, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, potHR = Potential-HR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology HR-HPV-Diagnostik, WHO = World Health Organization

* Für den QG-MPH wurden 18 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), für die PCR 14 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) und für den HC2 13 HR-HPV-Genotypen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) einbezogen

** WHO HR-HPV-Genotypen: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68

Einteilung nach Landis und Koch¹²⁵: gelb: $\kappa = 0-0,2$, orange: $\kappa = 0,21-0,4$, rot: $\kappa = 0,41-0,6$, lila $\kappa = 0,61-0,8$, blau: $\kappa = 0,81-1,0$

4.3 Sensitivität, Spezifität, positive und negative Likelihood Ratio

Zur Beurteilung der Qualität der QG-MPH HR-HPV- und QG-MPH Dysplasie-Diagnostik zur Zervixkarzinomdiagnostik wurden in dieser Arbeit Sens., Spez. sowie positive und negative LR

(LR^+ und LR^-) dieser und der in der MARZY-Studie durchgeführten Screeningmethoden bestimmt. Da die histologische Untersuchung einer bei der Kolposkopie entnommenen Gewebeprobe den aktuellen Goldstandard zur Diagnose eines Zervixkarzinoms und dessen Vorstufen darstellt, wurden deren Ergebnisse den Berechnungen zugrunde gelegt. Anschließend wurden die Resultate der verschiedenen Methoden untereinander verglichen.

4.3.1 Absolute Sensitivität, Spezifität sowie positive und negative Likelihood Ratio

Sens. und Spez. wurden in dieser Arbeit in zwei verschiedenen Varianten ermittelt. Die rohe Variante lässt den Verifikationsbias, der in dieser Arbeit hauptsächlich durch die Selektion der zur Kolposkopie eingeladenen Frauen (Frauen mit Indikationen durch HC2 bzw. Zytologie Ergebnis + 5 % zufällig bestimmter gesunder Frauen) und Nicht-Teilnahme einiger Eingeladener entsteht, unberücksichtigt. In der adjustierten Variante wurde dieser Bias (Verzerrung der Ergebnisse) herausgerechnet (s. Kapitel 3.3). Zur weiteren Einschätzung der klinischen Aussagekraft wurde darüber hinaus LR^+ und LR^- in roher und adjustierter Form bestimmt. Für die Bewertung der Ergebnisse der LR dient Tabelle 13 in Kapitel 3.3. Die genannten Berechnungen wurden für die QG-MPH CIN2+/-, QG-MPH CIN3+/- und QG-MPH HR-HPV-Diagnostik, die zwei zytologischen Untersuchungen LBC und PAP, die zwei DNA-basierten HPV-Tests HC2 und PCR sowie die vier Cotesting-Varianten vorgenommen. Letztere sind Kombinationen aus einer zytologischen Untersuchung und einem DNA-basierten HPV-Test, welche aufgrund der neuen Screeningbestimmungen von Januar 2020 als eine Erweiterung des Vorsorgeprogramms empfohlen werden. In dieser Arbeit werden folgende Kombinationen berücksichtigt:

- Cotesting 1 (LBC + PCR)
- Cotesting 2 (PAP + PCR)
- Cotesting 3 (LBC + HC2)
- Cotesting 4 (PAP + HC2)

Alle Berechnungen wurden für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ durchgeführt und mit einem 95 % KI angegeben. Für die beiden zytologischen Untersuchungen wurde auch hier der in Kapitel 4.1.1 definierte Cutoff verwendet. Wie auch in den anderen Analysen beruhen die PCR-Ergebnisse auf den Resultaten der GP5+/6+ RLB PCR. Da kein histologisch diagnostiziertes Karzinom im Studienkollektiv vorliegt, kann die QG-MPH CxCa-Diagnostik in dieser Arbeit nicht validiert werden.

Rohe Sensitivität, Spezifität sowie positive und negative Likelihood Ratio

Die nachfolgende Tabelle 21 stellt die Ergebnisse der rohen Sens., der rohen Spez. sowie der rohen LR^+ und LR^- dar. Es ist zu erkennen, dass für den histologischen Endpunkt CIN2+ der HC2 sowie die Cotestings 3 und 4 mit 89 % zwar die größte Sens., jedoch gleichzeitig auch die geringste Spez. aufweisen. Bei der Spez. zeigen v. a. die LBC (88 %), die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik (87 %), aber auch die QG-MPH CIN2+-Diagnostik (83 %) die höchsten Werte. Die beste LR^+ verbucht in dieser Gruppe die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik (4,13), wobei die QG-MPH CIN2+-Diagnostik mit einer LR^+ von 3,85 einen vergleichbaren Wert liefert. Diese Ergebnisse deuten gemäß Tabelle 13 zur Einschätzung der LR^+ zwar nur auf eine schwache diagnostische Evidenz hin (hohe diagnostische Evidenz ab $LR^+ > 5$), die Tendenz ist im Vergleich mit den anderen Testmethoden jedoch klar positiv. Bei der LR^- verbuchen der HC2 mit 0,28 und das Cotesting 3 mit 0,29 die besten Werte. Auch diese liefern eine nur schwache diagnostische Evidenz (s. Tabelle 13) und bedeuten, dass bei einem Gesunden die Wahrscheinlichkeit eines negativen Tests ca. 3,6-mal so hoch wie bei Kranken ist. Insgesamt sind für den histologischen Endpunkt CIN3+ ähnliche Ergebnisse zu vermerken. Hier haben die QG-MPH CIN3+-Diagnostik, die beiden DNA-basierten HPV-Tests sowie die vier Cotesting-Varianten mit 83 % die höchste Sens. Die höchste Spez. zeigt die LBC mit 89 %, gefolgt von der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik mit 85 % und der QG-MPH CIN3+-Diagnostik mit 82 %. Die beiden letztgenannten weisen darüber hinaus die besten Werte für die LR^+ (4,58) auf und liegen damit fast im Bereich einer hohen diagnostischen Evidenz (s. Tabelle 13). Sie sagen aus, dass bei Kranken die Wahrscheinlichkeit eines positiven Tests 4,58-mal so hoch wie bei Gesunden ist. Bezüglich der LR^- war einzig die QG-MPH CIN3+-Diagnostik mit 0,2 im Bereich der hohen diagnostischen Evidenz (s. Tabelle 13).

Ergebnisse

Tabelle 21: Rohe Sensitivitäten und Spezifitäten sowie positive und negative Likelihood Ratios für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ in Subpopulation 2.

Rohdaten	Histologie CIN2+				Histologie CIN3+			
	Sens. mit 95 % KI	Spez. mit 95 % KI	LR ⁺ mit 95 % KI	LR ⁻ mit 95 % KI	Sens. mit 95 % KI	Spez. mit 95 % KI	LR ⁺ mit 95 % KI	LR ⁻ mit 95 % KI
QG-MPH CIN2+	0,67 (0,30; 0,93)	0,83 (0,70; 0,92)	3,85 (1,81; 8,18)	0,40 (0,16; 1,02)	0,83 (0,36; 1,00)	0,82 (0,69; 0,91)	4,58 (2,36; 8,91)	0,20 (0,03; 1,22)
QG-MPH CIN3+	0,67 (0,30; 0,93)	0,83 (0,70; 0,92)	3,85 (1,81; 8,18)	0,40 (0,16; 1,02)	0,83 (0,36; 1,00)	0,82 (0,69; 0,91)	4,58 (2,36; 8,91)	0,20 (0,03; 1,22)
QG-MPH HR-HPV	0,56 (0,21; 0,86)	0,87 (0,74; 0,94)	4,13 (1,67; 10,19)	0,51 (0,25; 1,07)	0,67 (0,22; 0,96)	0,85 (0,73; 0,94)	4,58 (1,95; 10,77)	0,39 (0,13; 1,22)
PAP	0,33 (0,07; 0,70)	0,80 (0,66; 0,90)	1,67 (0,57; 4,90)	0,83 (0,51; 1,35)	0,33 (0,04; 0,78)	0,79 (0,66; 0,89)	1,61 (0,46; 5,59)	0,84 (0,47; 1,51)
LBC	0,22 (0,03; 0,60)	0,88 (0,77; 0,96)	1,93 (0,46; 8,09)	0,88 (0,61; 1,26)	0,33 (0,04; 0,78)	0,89 (0,78; 0,96)	3,06 (0,78; 11,91)	0,75 (0,42; 1,33)
HC2	0,89 (0,52; 1,00)	0,40 (0,27; 0,55)	1,49 (1,08; 2,06)	0,28 (0,04; 1,80)	0,83 (0,36; 1,00)	0,38 (0,25; 0,52)	1,35 (0,89; 2,04)	0,44 (0,07; 2,70)
PCR	0,67 (0,30; 0,93)	0,67 (0,53; 0,80)	2,04 (1,11; 3,73)	0,50 (0,19; 1,27)	0,83 (0,36; 1,00)	0,67 (0,53; 0,79)	2,55 (1,51; 4,29)	0,25 (0,04; 1,50)
Cotesting 1 (LBC + PCR)	0,67 (0,30; 0,93)	0,67 (0,53; 0,80)	2,04 (1,11; 3,73)	0,50 (0,19; 1,27)	0,83 (0,36; 1,00)	0,67 (0,53; 0,79)	2,55 (1,51; 4,29)	0,25 (0,04; 1,50)
Cotesting 2 (PAP + PCR)	0,67 (0,30; 0,93)	0,57 (0,42; 0,71)	1,55 (0,88; 2,70)	0,59 (0,23; 1,52)	0,83 (0,36; 1,00)	0,57 (0,43; 0,71)	1,96 (1,22; 3,14)	0,29 (0,05; 1,76)
Cotesting 3 (LBC + HC2)	0,89 (0,52; 1,00)	0,38 (0,25; 0,53)	1,44 (1,05; 1,98)	0,29 (0,04; 1,89)	0,83 (0,36; 1,00)	0,36 (0,24; 0,50)	1,31 (0,87; 1,97)	0,46 (0,07; 2,84)
Cotesting 4 (PAP + HC2)	0,89 (0,52; 1,00)	0,27 (0,16; 0,42)	1,23 (0,92; 1,63)	0,40 (0,06; 2,71)	0,83 (0,36; 1,00)	0,26 (0,15; 0,40)	1,13 (0,76; 1,66)	0,64 (0,10; 4,07)

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, KI = Konfidenzintervall, LBC = Liquid-Based Cytology, LR⁻ = Negative Likelihood Ratio, LR⁺ = Positive Likelihood Ratio, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology, Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität

Die beiden nachfolgenden Grafiken veranschaulichen die oben dargelegten Ergebnisse für den histologischen Endpunkt CIN2+ (Abbildung 12) und CIN3+ (Abbildung 13). Dabei ist der Test mit der größten Akkuratheit (unter Berücksichtigung von Sens. und Spez.) links oben zu finden. Dies ist bei Betrachtung der histologischen Gruppe CIN3+ die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik.

Ergebnisse

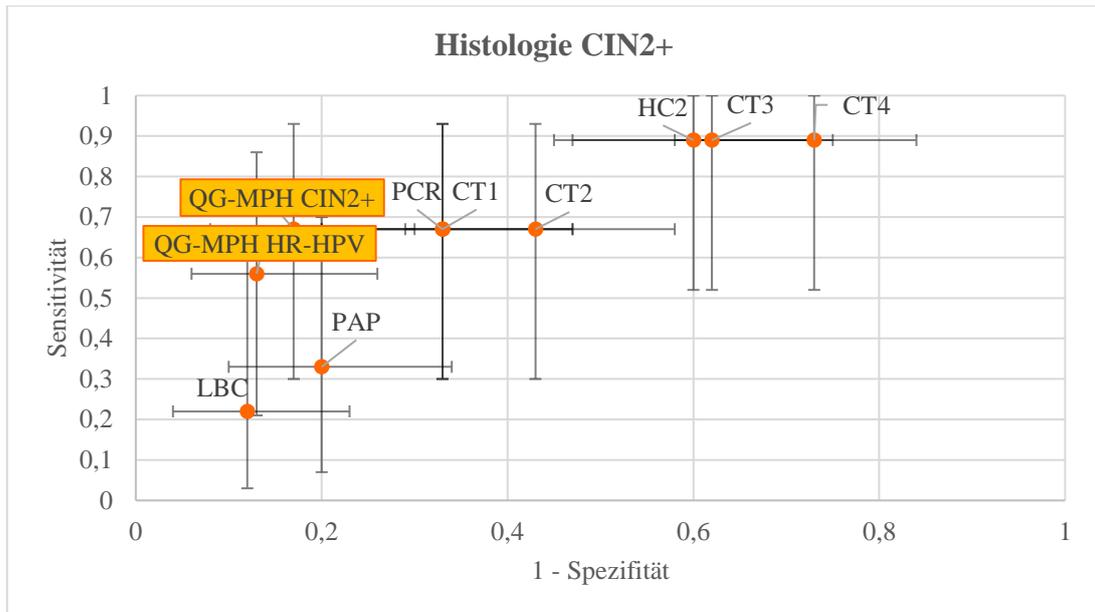


Abbildung 12: Darstellung der rohen Sensitivitäten und Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN2+ in Subpopulation 2. (*CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CT = Cotesting (CT1 = LBC + PCR, CT2 = PAPER + PCR, CT3 = LBC + HC2, CT4 = PAPER + HC2), HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, LBC = Liquid-Based Cytology, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology*)

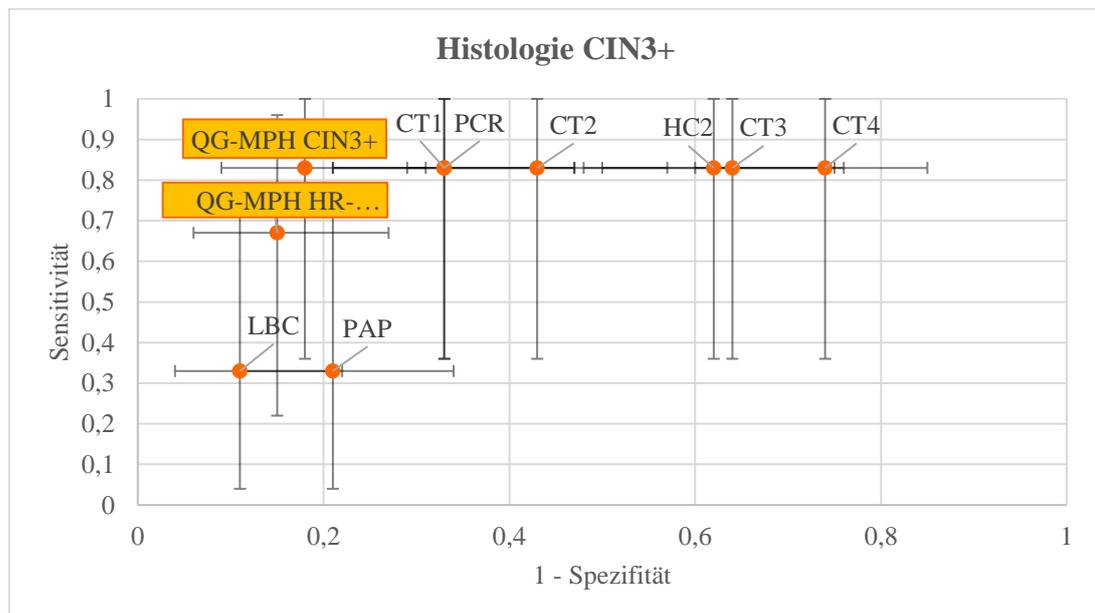


Abbildung 13: Darstellung der rohen Sensitivitäten und Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN3+ in Subpopulation 2. (*CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CT = Cotesting (CT1 = LBC + PCR, CT2 = PAPER + PCR, CT3 = LBC + HC2, CT4 = PAPER + HC2), HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, LBC = Liquid-Based Cytology, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology*)

Adjustierte Sensitivität, Spezifität sowie positive und negative Likelihood Ratio

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der adjustierten Variante von Sens., Spez., LR⁺ und LR⁻ aufgezeigt. Hierbei werden der Verifikationsbias und eine möglicherweise daraus

Ergebnisse

resultierende Überschätzung der Sens. und Unterschätzung der Spez. herausgerechnet. Die gegenüber den rohen Werten (s. o.) verminderten Sens. und gleichzeitige erhöhten Spez. sind in Tabelle 22 deutlich zu erkennen. So zeigen auch bei diesen Berechnungen der HC2 sowie die Cotestings 3 und 4 für den Endpunkt CIN2+ mit 37 % die höchste Sens., während für den Endpunkt CIN3+ die QG-MPH CIN3+-Diagnostik, die beiden DNA-basierten HPV-Tests und die vier Cotestings mit 27 % die höchste Sens. aufweisen. Legt man die adjustierte Spez. zugrunde, erzielen die LBC mit 98 %, gefolgt von der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik mit 97 % und dem PAP mit 96 % für beide Endpunkte die höchsten Werte. Die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik erreicht mit einer LR⁺ von 7,80 bzw. 6,38 eine hohe diagnostische Evidenz (s. Tabelle 13) im Sinne von Akkuratheit. Bei der LR⁻ dagegen verzeichnen alle Methoden eine kaum relevante diagnostische Evidenz (s. Tabelle 13). Bezüglich der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik fällt auf, dass die QG-MPH CIN2+- und die QG-MPH CIN 3+-Diagnostik genau die gleichen Ergebnisse erzielt haben. Hierbei handelt es sich nicht um einen Fehler der Dokumentation.

Tabelle 22: Adjustierte Sensitivitäten, Spezifitäten sowie positive und negative Likelihood Ratios für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ in Subpopulation 2.

Adjustierte Daten	Histologie CIN2+				Histologie CIN3+			
	Sens. mit 95 % KI	Spez. mit 95 % KI	LR ⁺ mit 95 % KI	LR ⁻ mit 95 % KI	Sens. mit 95 % KI	Spez. mit 95 % KI	LR ⁺ mit 95 % KI	LR ⁻ mit 95 % KI
QG-MPH CIN2+	0,27 (0,06; 1,00)	0,85 (0,67; 0,98)	1,83 (0,35; 29,84)	0,85 (0,00; 1,22)	0,27 (0,06; 1,00)	0,85 (0,67; 0,98)	1,74 (0,27; 32,93)	0,87 (0,00; 1,25)
QG-MPH CIN3+	0,27 (0,06; 1,00)	0,85 (0,67; 0,98)	1,83 (0,35; 29,84)	0,85 (0,00; 1,22)	0,27 (0,06; 1,00)	0,85 (0,67; 0,98)	1,74 (0,27; 32,93)	0,87 (0,00; 1,25)
QG-MPH HR-HPV	0,23 (0,05; 0,88)	0,97 (0,95; 0,99)	7,80 (1,35; 55,55)	0,79 (0,13; 0,99)	0,21 (0,03; 1,00)	0,97 (0,94; 0,99)	6,38 (0,62; 48,23)	0,82 (0,00; 1,01)
PAP	0,14 (0,00; 0,67)	0,96 (0,94; 0,98)	3,74 (0,00; 21,14)	0,89 (0,35; 1,04)	0,11 (0,00; 0,75)	0,96 (0,94; 0,98)	2,63 (0,00; 21,37)	0,93 (0,26; 1,06)
LBC	0,09 (0,00; 0,50)	0,98 (0,95; 0,99)	3,66 (0,00; 31,45)	0,93 (0,51; 1,04)	0,11 (0,00; 0,80)	0,98 (0,95; 0,99)	4,30 (0,00; 52,92)	0,92 (0,21; 1,04)
HC2	0,37 (0,11; 1,00)	0,87 (0,84; 0,89)	2,72 (0,65; 8,92)	0,73 (0,00; 1,07)	0,27 (0,06; 1,00)	0,85 (0,83; 0,87)	1,82 (0,32; 7,90)	0,86 (0,00; 1,15)
PCR	0,27 (0,06; 1,00)	0,82 (0,64; 0,95)	1,50 (0,30; 13,09)	0,89 (0,00; 1,26)	0,27 (0,06; 1,00)	0,81 (0,65; 0,95)	1,43 (0,26; 16,04)	0,90 (0,00; 1,30)
Cotesting 1 (LBC + PCR)	0,27 (0,06; 1,00)	0,82 (0,64; 0,95)	1,50 (0,30; 13,09)	0,89 (0,00; 1,26)	0,27 (0,06; 1,00)	0,81 (0,65; 0,95)	1,43 (0,26; 16,04)	0,90 (0,00; 1,30)
Cotesting 2 (PAP + PCR)	0,28 (0,07; 1,00)	0,80 (0,63; 0,93)	1,40 (0,28; 10,61)	0,90 (0,00; 1,28)	0,27 (0,06; 1,00)	0,80 (0,63; 0,93)	1,35 (0,26; 12,76)	0,91 (0,00; 1,31)
Cotesting 3 (LBC + HC2)	0,37 (0,11; 1,00)	0,86 (0,83; 0,89)	2,65 (0,65; 8,75)	0,74 (0,00; 1,07)	0,27 (0,06; 1,00)	0,85 (0,82; 0,87)	1,78 (0,31; 7,78)	0,86 (0,00; 1,15)
Cotesting 4 (PAP + HC2)	0,37 (0,11; 1,00)	0,84 (0,81; 0,86)	2,36 (0,58; 7,38)	0,74 (0,00; 1,10)	0,27 (0,06; 1,00)	0,83 (0,80; 0,85)	1,60 (0,28; 6,70)	0,88 (0,00; 1,19)

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, KI = Konfidenzintervall, LBC = Liquid-Based Cytology, LR⁻ = Negative Likelihood Ratio, LR⁺ = Positive Likelihood Ratio, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology, Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität

Ergebnisse

Die Abbildungen 14 und 15 stellen die Ergebnisse der adjustierten Sens. und Spez. für den histologischen Endpunkt CIN2+ bzw. CIN3+ dar.

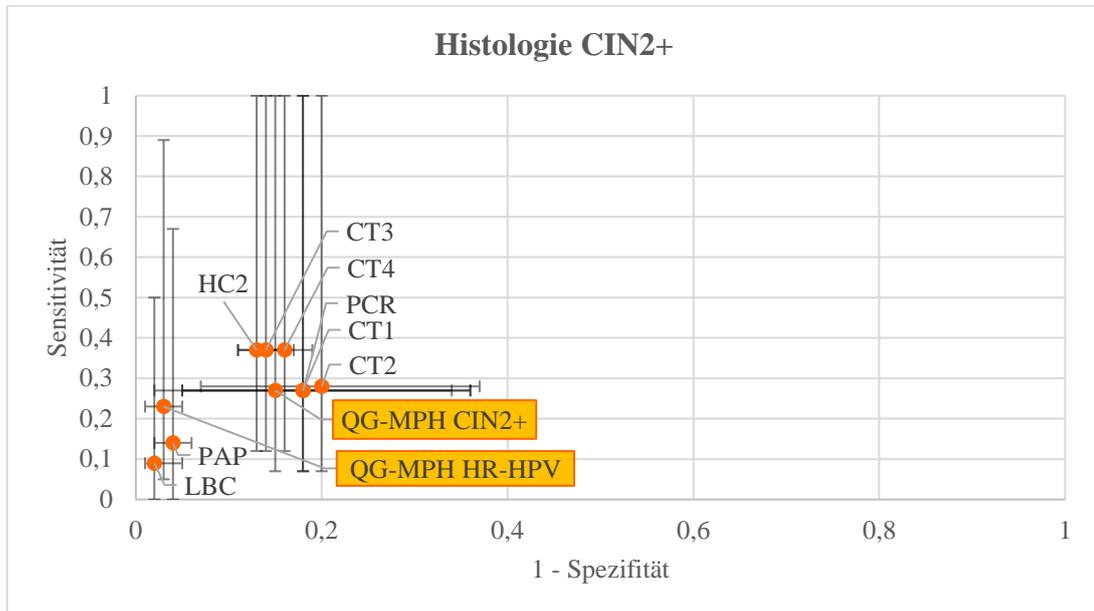


Abbildung 14: Darstellung der adjustierten Sensitivitäten und Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN2+ in Subpopulation 2. (*CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia*, *CT = Cotesting* (*CT1 = LBC + PCR*, *CT2 = PAP + PCR*, *CT3 = LBC + HC2*, *CT4 = PAP + HC2*), *HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test*, *HPV = Humanes Papillomvirus*, *HR-HPV = High-Risk-HPV*, *LBC = Liquid-Based Cytology*, *PCR = GP5+/6+ RLB PCR*, *QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology*)

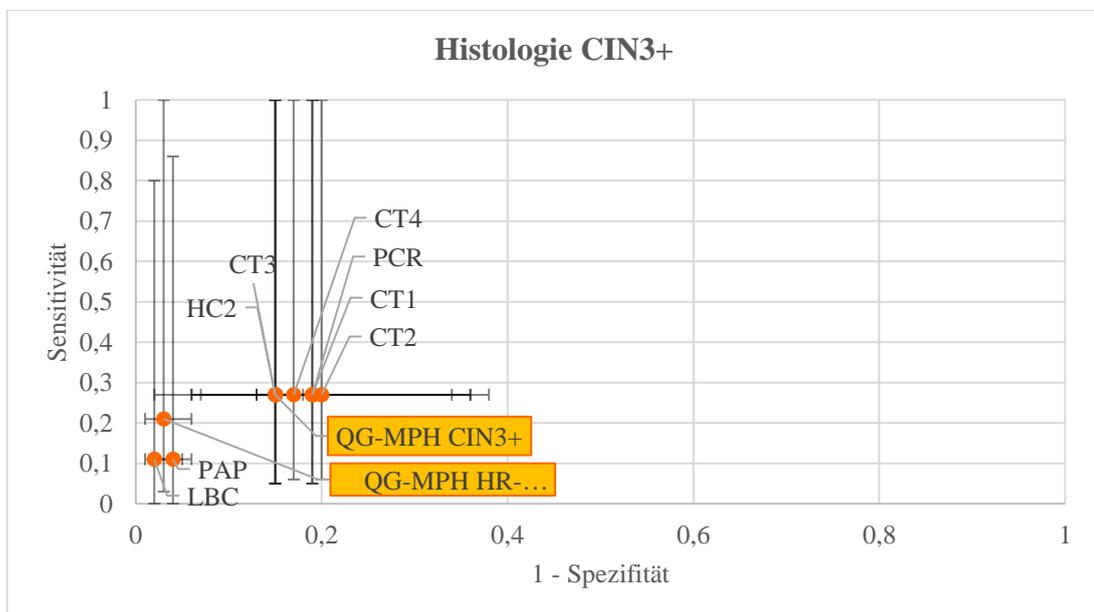


Abbildung 15: Darstellung der adjustierten Sensitivitäten und Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN3+ in Subpopulation 2. (*CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia*, *CT = Cotesting* (*CT1 = LBC + PCR*, *CT2 = PAP + PCR*, *CT3 = LBC + HC2*, *CT4 = PAP + HC2*), *HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test*, *HPV = Humanes Papillomvirus*, *HR-HPV = High-Risk-HPV*, *LBC = Liquid-Based Cytology*, *PCR = GP5+/6+ RLB PCR*, *QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology*)

Ergebnisse

Die Berechnungen der rohen und adjustierten Sens., Spez. sowie LR⁺ und LR⁻ wurden darüber hinaus auch unter Verwendung des Cutoffs PAP IIID für den PAP und für die LBC vorgenommen. Die Erhöhung des Cutoffs auf PAP IIID (gegenüber PAP IIw) führt für die beiden zytologischen Untersuchungen und folglich auch für die Cotestings zu einer Erhöhung der Spez. um bis zu 12 Prozentpunkte bei gleicher Sens. und dementsprechend einer Verbesserung der LR⁺ und LR⁻. In Tabelle 23 und 24 sind die detaillierten Ergebnisse hierzu ausgeführt. Aus heutiger Sicht wäre PAP IIID der passendere Cutoff für die Zytologie, um weitere Abklärungsuntersuchungen zu veranlassen.

Tabelle 23: Rohe Sensitivitäten, Spezifitäten sowie positive und negative Likelihood Ratios unter Verwendung des Cutoffs PAP IIID für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ in Subpopulation 2.

Rohdaten	Histologie CIN2+				Histologie CIN3+			
	Sens. mit 95% KI	Spez. mit 95% KI	LR ⁺ mit 95% KI	LR ⁻ mit 95% KI	Sens. mit 95% KI	Spez. mit 95% KI	LR ⁺ mit 95% KI	LR ⁻ mit 95% KI
PAP	0,33 (0,07;0,70)	0,92 (0,81;0,98)	4,17 (1,12;15,57)	0,72 (0,45;1,16)	0,33 (0,04;0,78)	0,91 (0,79;0,97)	3,53 (0,87;14,41)	0,74 (0,42;1,30)
LBC	0,22 (0,03;0,60)	0,90 (0,79;0,97)	2,31 (0,53;10,15)	0,86 (0,60;1,23)	0,33 (0,04;0,78)	0,91 (0,80;0,97)	3,67 (0,90;14,97)	0,73 (0,41;1,30)
Cotesting 1 (LBC + PCR)	0,67 (0,30;0,93)	0,67 (0,53;0,80)	2,04 (1,11; 3,73)	0,50 (0,19;1,27)	0,83 (0,36;1,00)	0,67 (0,53;0,79)	2,55 (1,51; 4,29)	0,25 (0,04;1,50)
Cotesting 2 (PAP + PCR)	0,67 (0,30;0,93)	0,65 (0,50;0,78)	1,89 (1,04; 3,42)	0,52 (0,20;1,33)	0,83 (0,36;1,00)	0,65 (0,51;0,77)	2,37 (1,42; 3,94)	0,26 (0,04;1,56)
Cotesting 3 (LBC + HC2)	0,89 (0,52;1,00)	0,40 (0,27;0,55)	1,49 (1,08; 2,06)	0,28 (0,04;1,80)	0,83 (0,36;1,00)	0,38 (0,25;0,52)	1,35 (0,89; 2,04)	0,44 (0,07;2,70)
Cotesting 4 (PAP + HC2)	0,89 (0,52;1,00)	0,37 (0,24;0,52)	1,42 (1,04; 1,94)	0,30 (0,05;1,96)	0,83 (0,36;1,00)	0,35 (0,23;0,49)	1,29 (0,85; 1,93)	0,47 (0,08;2,94)

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, KI = Konfidenzintervall, LBC = Liquid-Based Cytology, LR⁻ = Negative Likelihood Ratio, LR⁺ = Positive Likelihood Ratio, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität

Tabelle 24: Adjustierte Sensitivitäten, Spezifitäten sowie positive und negative Likelihood Ratios unter Verwendung des Cutoffs PAP IIID für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ in Subpopulation 2.

Adjustierte Daten	Histologie CIN2+				Histologie CIN3+			
	Sens. mit 95% KI	Spez. mit 95% KI	LR ⁺ mit 95% KI	LR ⁻ mit 95% KI	Sens. mit 95% KI	Spez. mit 95% KI	LR ⁺ mit 95% KI	LR ⁻ mit 95% KI
PAP	0,14 (0,00;0,67)	0,98 (0,96;1,00)	8,35 (0,00;71,09)	0,87 (0,34;1,02)	0,11 (0,00;0,75)	0,98 (0,96;1,00)	5,18 (0,00;61,61)	0,91 (0,26;1,03)
LBC	0,09 (0,00;0,50)	0,98 (0,96;1,00)	4,22 (0,00;40,03)	0,93 (0,51;1,03)	0,11 (0,00;0,80)	0,98 (0,96;1,00)	4,95 (0,00;66,47)	0,91 (0,21;1,03)
Cotesting 1 (LBC + PCR)	0,27 (0,06;1,00)	0,82 (0,64;0,95)	1,50 (0,30;13,09)	0,89 (0,00;1,26)	0,27 (0,06;1,00)	0,81 (0,65;0,95)	1,43 (0,26;16,04)	0,90 (0,00;1,30)
Cotesting 2 (PAP + PCR)	0,28 (0,07;1,00)	0,81 (0,64;0,95)	1,50 (0,30;12,12)	0,88 (0,00;1,26)	0,27 (0,06;1,00)	0,81 (0,64;0,94)	1,44 (0,26;15,08)	0,90 (0,00;1,29)
Cotesting 3 (LBC + HC2)	0,37 (0,11;1,00)	0,87 (0,84;0,89)	2,72 (0,65; 8,92)	0,73 (0,00;1,07)	0,27 (0,06;1,00)	0,85 (0,83;0,87)	1,82 (0,32; 7,90)	0,86 (0,00;1,15)
Cotesting 4 (PAP + HC2)	0,37 (0,11;1,00)	0,86 (0,83;0,88)	2,63 (0,64; 8,42)	0,73 (0,00;1,08)	0,27 (0,06;1,00)	0,85 (0,82;0,87)	1,77 (0,31; 7,49)	0,86 (0,00;1,16)

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, KI = Konfidenzintervall, LBC = Liquid-Based Cytology, LR⁻ = Negative Likelihood Ratio, LR⁺ = Positive Likelihood Ratio, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität

4.3.2 Relative Sensitivität und Spezifität

Im nachfolgenden Unterkapitel werden die Ergebnisse der absoluten Sens. und Spez. der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik denen der anderen Verfahren gegenübergestellt sowie auf signifikante Unterschiede hin überprüft (s. Kapitel 4.3.1). Darüber hinaus werden auch die Ergebnisse der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik mit denen der beiden DNA-basierten HPV-Tests verglichen und ebenfalls in Hinblick auf signifikante Unterschiede analysiert. Dazu wurden sowohl das Verhältnis der Sens. bzw. Spez. der gegenübergestellten Tests als auch ein 95 % KI berechnet, das die Signifikanz der Ergebnisse bestimmt. Da die QG-MPH Dysplasie- bzw. QG-MPH HR-HPV-Diagnostik jeweils den Dividenden bilden, weisen alle Werte > 1 auf ein im Vergleich besseres Ergebnis des QG-MPH hin, während alle Werte < 1 für ein besseres Ergebnis des Vergleichstests sprechen. Ein Ergebnis gilt als signifikant, wenn das 95 % KI den Wert 1 nicht beinhaltet, wohingegen die Intervalle, die den Wert 1 einschließen, als nicht signifikant gelten. Alle Berechnungen wurden sowohl für die rohen als auch für die adjustierten Werte vorgenommen.

Histologischer Endpunkt CIN2+

Die in diesem Abschnitt berechneten Verhältnisse verdeutlichen, dass die QG-MPH CIN2+-Diagnostik für den histologischen Endpunkt CIN2+ sensitiver ist als die zytologischen Untersuchungsmethoden LBC und PAP. Dabei weisen die Vergleiche, abgesehen von der adjustierten Sens. der QG-MPH CIN2+-Diagnostik vs. der des PAP, auch signifikante

Ergebnisse

Unterschiede auf. Sensitiver als die QG-MPH CIN2+-Diagnostik sind lediglich der HC2, die Cotestings 3 und 4 sowie bei Betrachtung der adjustierten Werte auch geringfügig (0,27 vs. 0,28) das Cotesting 2. Diese Vergleiche verzeichnen jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik weist zwar bezüglich der Sens. etwas schlechtere Resultate auf als die DNA-basierten HPV-Tests, jedoch sind auch diese Unterschiede nicht signifikant. Bezüglich der rohen Spez. fällt v. a. auf, dass die QG-MPH CIN2+-Diagnostik außer im Vergleich zur LBC spezifischer ist als alle anderen Methoden. Dabei zeigen die Vergleiche der QG-MPH CIN2+-Diagnostik mit dem HC2, der PCR und den vier Cotesting-Varianten signifikante Unterschiede. Unter Betrachtung der adjustierten Spez. haben die beiden zytologischen Untersuchungen, der HC2 und das Cotesting 3 höhere Werte als die QG-MPH CIN2+-Diagnostik, aber ohne Signifikanz zu erreichen. Die guten Ergebnisse der absoluten Spez. der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik spiegeln sich in der Tatsache wider, dass sich diese Methode sowohl bezüglich der rohen als auch der adjustierten Ergebnisse signifikant spezifischer erweist als die beiden DNA-basierten HPV-Tests. Alle Ergebnisse der relativen Sens. bzw. Spez. für den histologischen Endpunkt CIN2+ werden in den Abbildungen 16 und 17 ausführlich dargestellt.

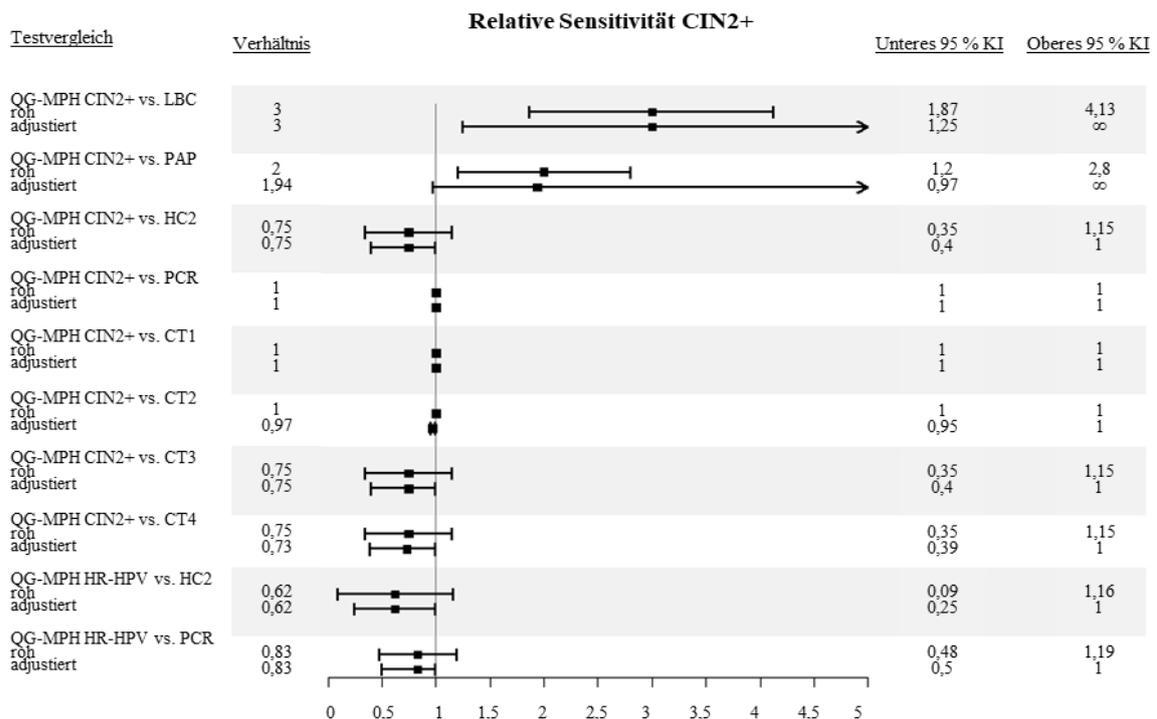


Abbildung 16: Relative Sensitivitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN2+ in Subpopulation 2. (CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CT = Cotesting (CT1 = LBC + PCR, CT2 = PAP + PCR, CT3 = LBC + HC2, CT4 = PAP + HC2), HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, LBC = Liquid-Based Cytology, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology)

Ergebnisse

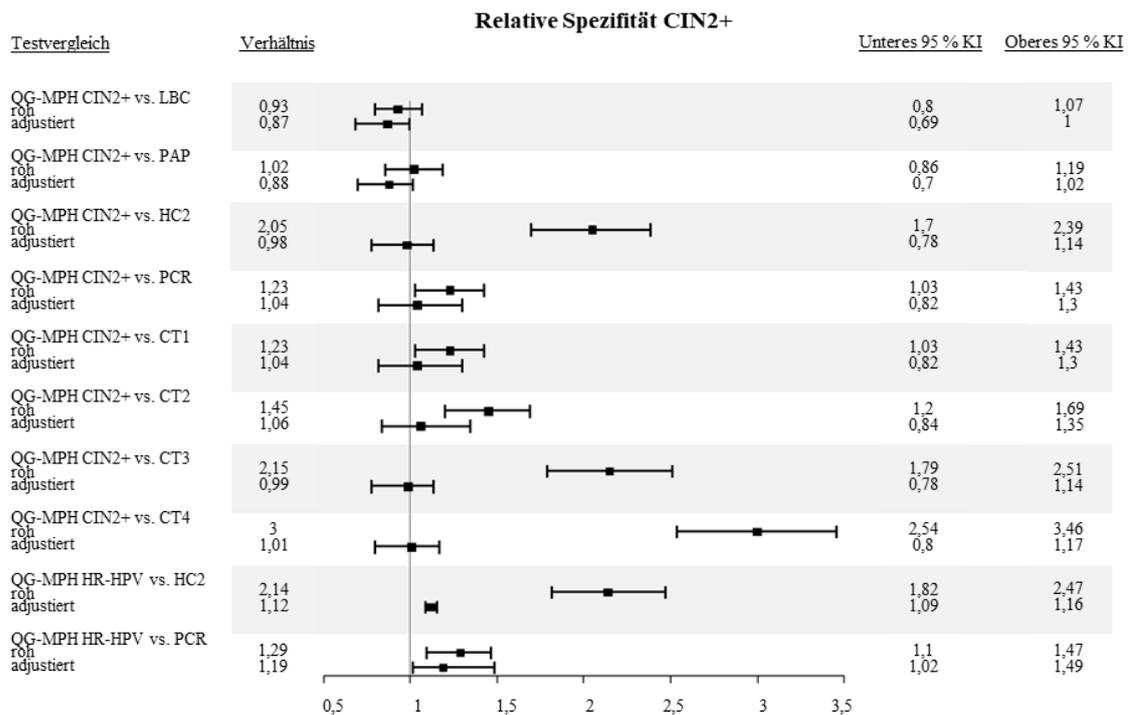


Abbildung 17: Relative Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN2+ in Subpopulation 2. (CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CT = Cotesting (CT1 = LBC + PCR, CT2 = PAP + PCR, CT3 = LBC + HC2, CT4 = PAP + HC2), HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, LBC = Liquid-Based Cytology, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology)

Histologischer Endpunkt CIN3+

Setzt man die rohe und adjustierte Sens. der QG-MPH CIN3+-Diagnostik und die der zytologischen Untersuchungen für den histologischen Endpunkt CIN3+ ins Verhältnis, werden die guten absoluten Ergebnisse der QG-MPH CIN3+-Diagnostik mit Werten deutlich > 1 bestätigt. Die Unterschiede zwischen den Rohwerten der QG-MPH CIN3+-Diagnostik und denen der beiden zytologischen Methoden sind dabei auch signifikant. Im Vergleich mit allen weiteren Tests stellt sich die QG-MPH CIN3+-Diagnostik nahezu identisch mit diesen dar, sodass keine weiteren signifikanten Unterschiede verzeichnet wurden. Die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik erweist sich erneut als weniger sensitiv als die DNA-basierten HPV-Tests, wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede verzeichnet wurden. Bezüglich der Spez. werden für den histologischen Endpunkt CIN3+ die gleichen Tendenzen wie beim histologischen Endpunkt CIN2+ gefunden. Abbildungen 18 (Sens.) und 19 (Spez.) präsentieren nachfolgend die ausführliche Analyse für den histologischen Endpunkt CIN3+.

Ergebnisse

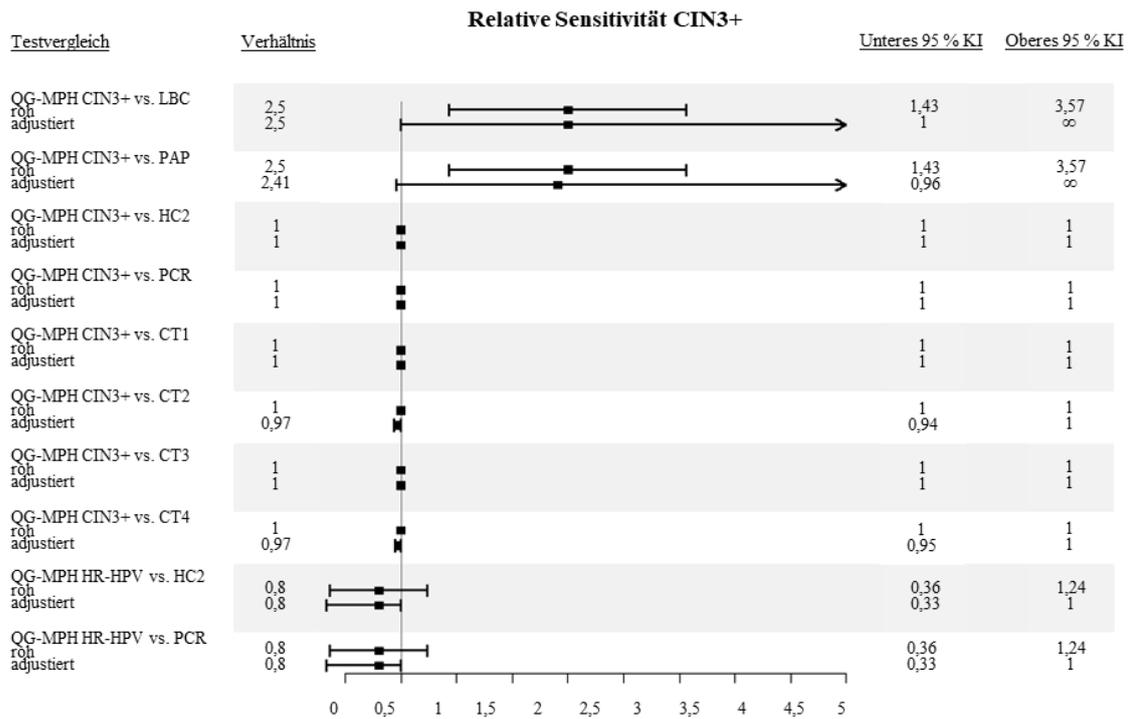


Abbildung 18: Relative Sensitivitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN3+ in Subpopulation 2. (CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CT = Cotesting (CT1 = LBC + PCR, CT2 = PAP + PCR, CT3 = LBC + HC2, CT4 = PAP + HC2), HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, LBC = Liquid-Based Cytology, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology)

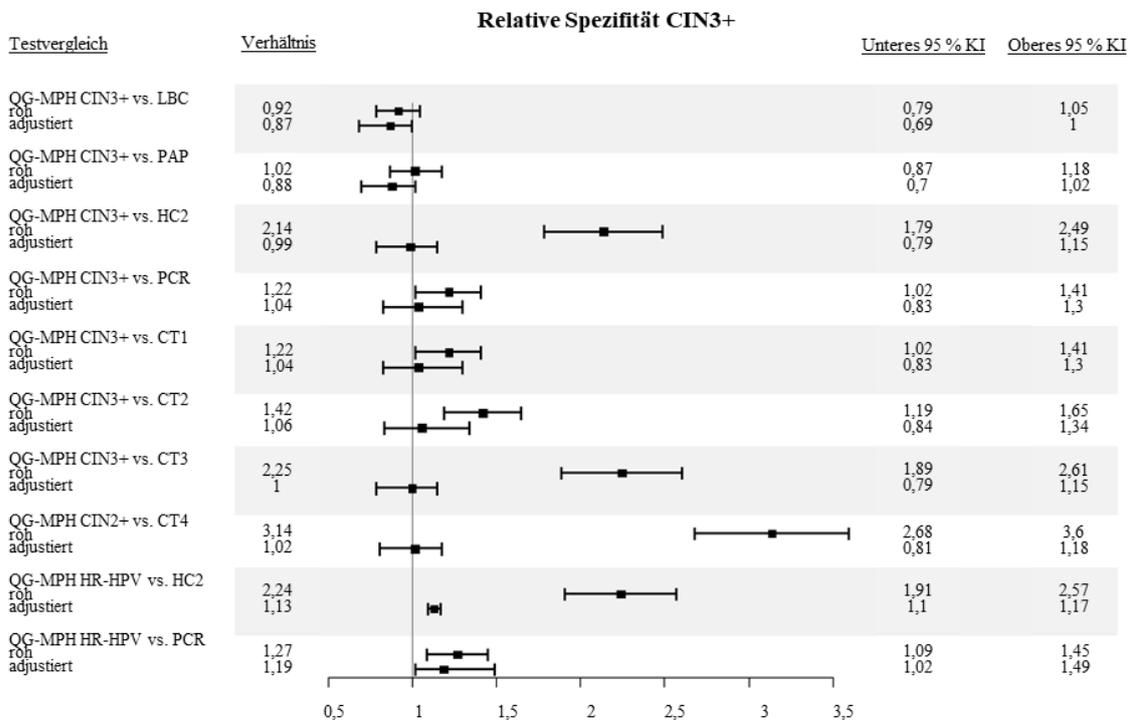


Abbildung 19: Relative Spezifitäten mit Konfidenzintervallen für den histologischen Endpunkt CIN3+ in Subpopulation 2. (CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CT = Cotesting (CT1 = LBC + PCR, CT2 = PAP + PCR, CT3 = LBC + HC2, CT4 = PAP + HC2), HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, LBC = Liquid-Based Cytology, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology)

Ergebnisse

In den Abbildungen 20 bis 23 sind dieselben Analysen (Forest Plots) unter Verwendung des zytologischen Cutoffs PAP IIID dargestellt. Mit diesem erhöhten Cutoff zeigt die PAP-Untersuchung, anders als mit dem Cutoff PAP IIw, gegenüber der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik für beide histologische Endpunkte eine signifikant höhere rohe Spez. Alle weiteren Resultate bleiben im Wesentlichen unverändert.

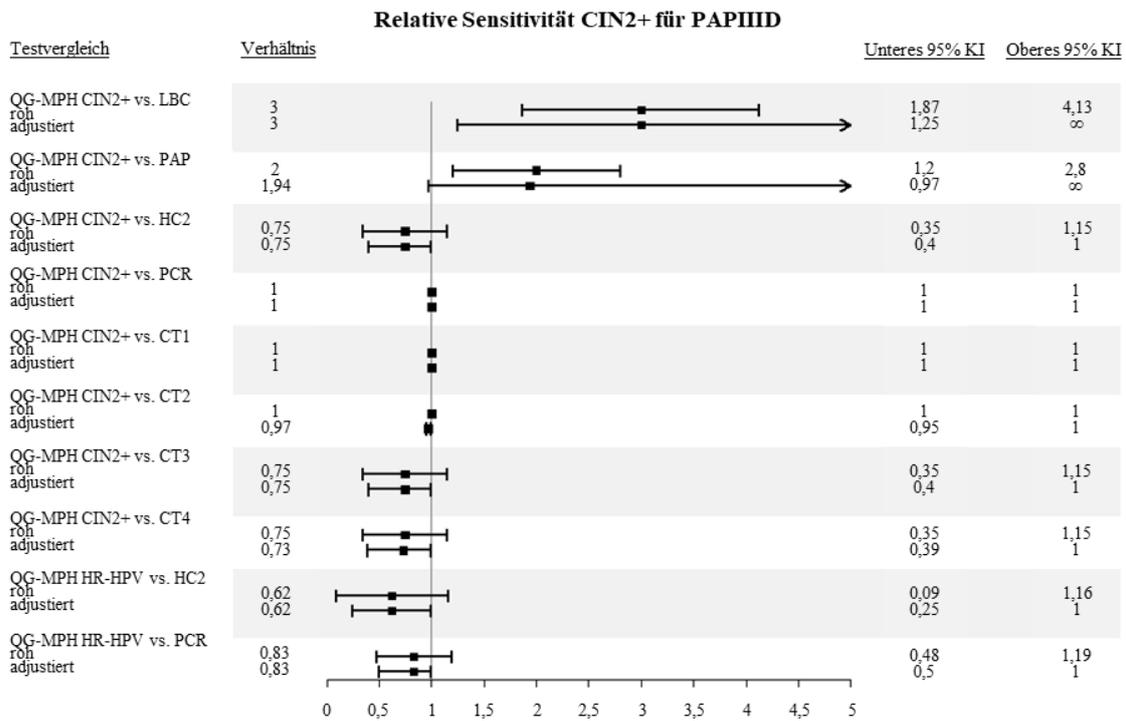


Abbildung 20: Relative Sensitivitäten mit Konfidenzintervallen unter Verwendung des Cutoffs PAPIIID für den histologischen Endpunkte CIN2+ in Subpopulation 2. (*CIN* = *Cervical Intraepithelial Neoplasia*, *CT* = *Cotesting* (*CT1* = *LBC* + *PCR*, *CT2* = *PAP* + *PCR*, *CT3* = *LBC* + *HC2*, *CT4* = *PAP* + *HC2*), *HC2* = *Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test*, *HPV* = *Humanes Papillomvirus*, *HR-HPV* = *High-Risk-HPV*, *LBC* = *Liquid-Based Cytology*, *PCR* = *GP5+/6+ RLB PCR*, *QG-MPH* = *QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology*)

Ergebnisse

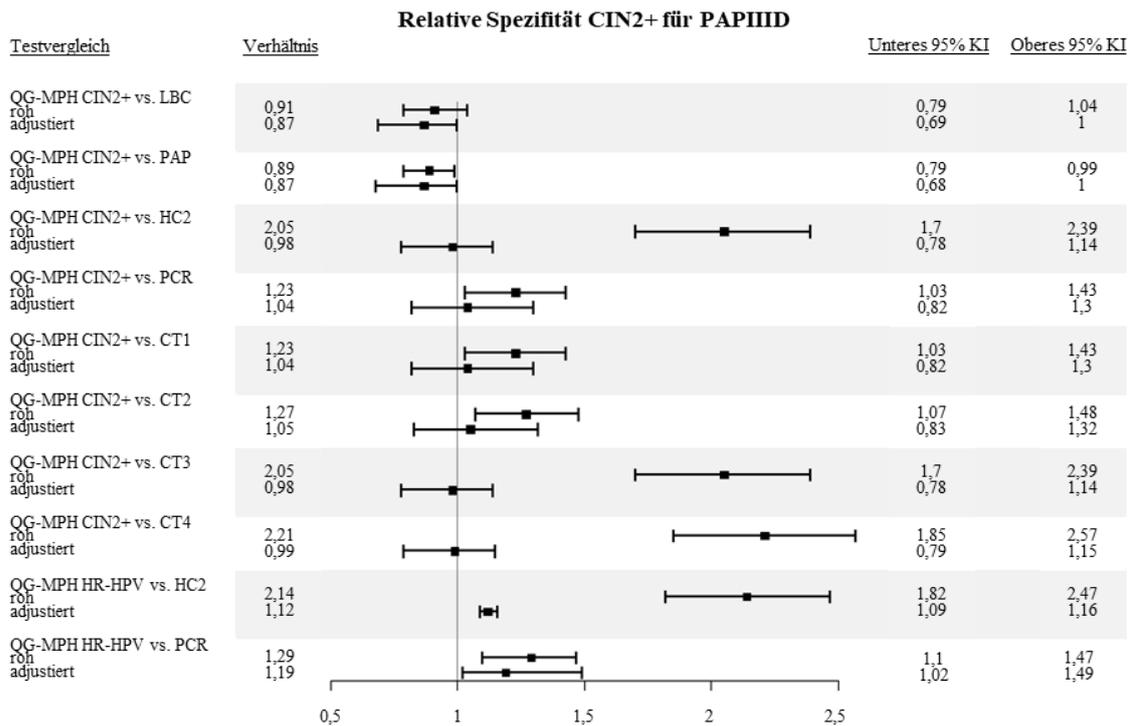


Abbildung 21: Relative Spezifitäten mit Konfidenzintervallen unter Verwendung des Cutoffs PAPIIID für den histologischen Endpunkte CIN2+ in Subpopulation 2. (*CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia*, *CT = Cotesting* (*CT1 = LBC + PCR*, *CT2 = PAP + PCR*, *CT3 = LBC + HC2*, *CT4 = PAP + HC2*), *HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test*, *HPV = Humanes Papillomvirus*, *HR-HPV = High-Risk-HPV*, *LBC = Liquid-Based Cytology*, *PCR = GP5+/6+ RLB PCR*, *QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology*)

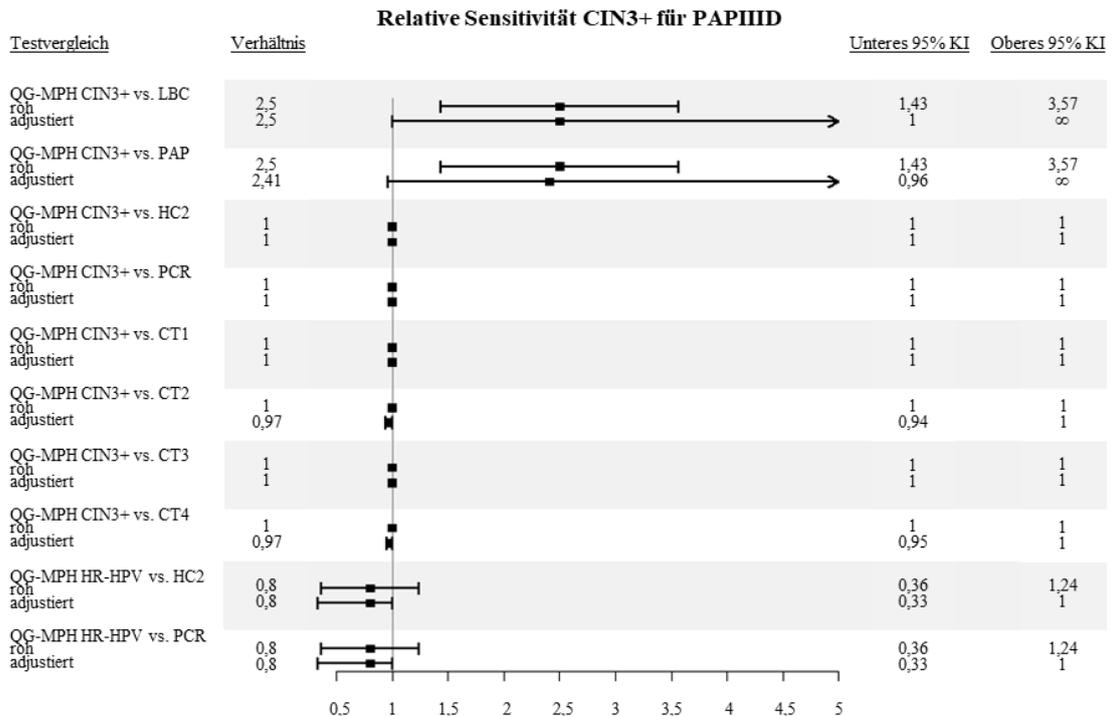


Abbildung 22: Relative Sensitivitäten mit Konfidenzintervallen unter Verwendung des Cutoffs PAPIIID für den histologischen Endpunkte CIN3+ in Subpopulation 2. (*CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia*, *CT = Cotesting* (*CT1 = LBC + PCR*, *CT2 = PAP + PCR*, *CT3 = LBC + HC2*, *CT4 = PAP + HC2*), *HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test*, *HPV = Humanes Papillomvirus*, *HR-HPV = High-Risk-HPV*, *LBC = Liquid-Based Cytology*, *PCR = GP5+/6+ RLB PCR*, *QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology*)

Ergebnisse

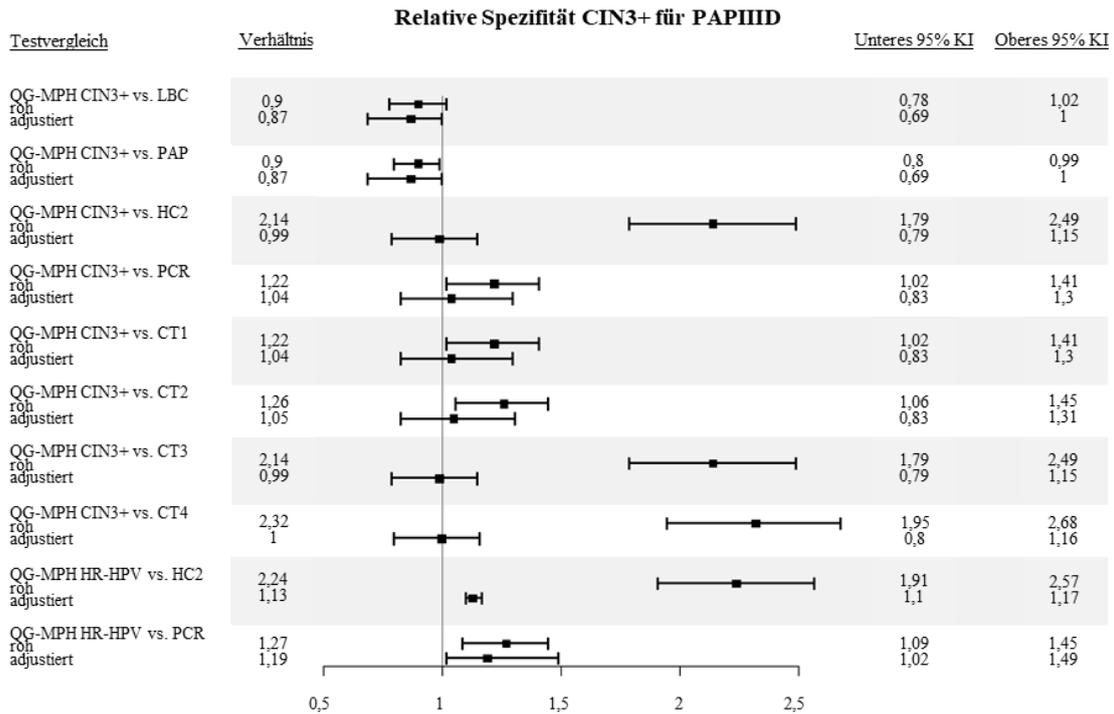


Abbildung 23: Relative Spezifitäten mit Konfidenzintervallen unter Verwendung des Cutoffs PAP IIID für den histologischen Endpunkte CIN3+ in Subpopulation 2. (*CIN* = *Cervical Intraepithelial Neoplasia*, *CT* = *Cotesting* (*CT1* = *LBC* + *PCR*, *CT2* = *PAP* + *PCR*, *CT3* = *LBC* + *HC2*, *CT4* = *PAP* + *HC2*), *HC2* = *Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test*, *HPV* = *Humanes Papillomvirus*, *HR-HPV* = *High-Risk-HPV*, *LBC* = *Liquid-Based Cytology*, *PCR* = *GP5+/6+ RLB PCR*, *QG-MPH* = *QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology*)

4.4 Prognostische Aussagekraft des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests

In diesem Kapitel soll mithilfe der FU-Ergebnisse der Studienteilnehmerinnen die prognostische Fähigkeit des QG-MPH-Test, also die Vorhersagekraft bezüglich der Entwicklung einer Erkrankung, beurteilt werden. Für diese Analysen wurde neben den generellen QuantiGene-spezifischen Ausschlusskriterien, „Therapie nach BL“ als zusätzliches definiert. Insgesamt schließt dieser zweite Teil der statistischen Auswertungen 499 Studienteilnehmerinnen (s. Kapitel 3.1.2) ein. Unter diesen waren nur zwei Frauen mit histologischem Ergebnis in BL und FU, was bei einer Subpopulation einer Screeningstudie auch nicht verwunderlich ist. Da aufgrund dieser sehr geringen Zahl keine aussagekräftigen statistischen Berechnungen zur Prognostik möglich sind, werden im Rahmen dieser Arbeit nur deskriptive Analysen und Fallbeschreibungen vorgestellt.

4.4.1 Deskriptive Follow-up-Analyse

Zunächst wird die für die FU-Analysen herangezogene Subpopulation ausführlich bezüglich progredierender, persistierender und regredierender FU-Ergebnisse der jeweiligen Testverfahren

beschrieben. Da in diese Analysen eine andere Subpopulation als in die Querschnittsanalysen eingeht, kommt es zu Abweichungen zu den oben genannten BL-Werten.

Ausgehend von den positiven BL-Ergebnissen der jeweiligen Tests zeigt Tabelle 25, wie viele Frauen im mindestens zweijährlichen FU mit derselben diagnostischen Methode erneut positiv bzw. negativ getestet wurden und damit als persistierend bzw. ausgeheilt gelten. Insgesamt zeigen von den 104 bzw. 103 der im BL QG-MPH CIN2+- bzw. QG-MPH CIN3+-positiven Frauen 40,4 % bzw. 39,8 % ein persistierendes Ergebnis im FU und 59,6 % bzw. 60,2 % wurden dieser Untersuchungsmethode zufolge als ausgeheilt eingestuft. Bezüglich der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik kann gesagt werden, dass von den 18 initialen HPV-Infektionen bei vier Frauen eine persistierende HPV-Infektion festgestellt wurde. Von den acht im BL histologisch CIN2+ diagnostizierten Frauen liegt für eine auch im FU ein histologisches Ergebnis vor, welches wiederum eine persistierende zervikale CIN2+ anzeigt. Bei den anderen sieben initialen CIN2+-Patientinnen, darunter fünf CIN3+, kann aufgrund der größtenteils unauffälligen FU-Screeningergebnisse und fehlender zweiter histologischer Untersuchung eine Ausheilung lediglich vermutet werden. Eine genaue Falldarstellung mit Biomarkeranalyse dieser histologisch auffälligen Patientinnen erfolgt in Kapitel 4.3.3.

Ausgehend von allen negativen Befunden in der BL-Untersuchung zeigt Tabelle 26, wie viele Fälle in der FU-Untersuchung für den jeweiligen Test weiterhin ohne pathologischen Befund blieben und wie viele Neuerkrankungen verzeichnet wurden. Der QG-MPH CIN2+- bzw. QG-MPH CIN3+-Diagnostik zufolge kam es hierbei zu 81 bzw. 77 Neuerkrankungen, während die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik 17 Neuinfektionen detektierte. Auch hier muss bezüglich der histologischen Ergebnisse angemerkt werden, dass die negativen BL-Befunde nur Annahmen sind, da die meisten Patientinnen mit unauffälligen Abstrichen keine histologische Untersuchung erhalten hatten. Insgesamt wurden im FU mittels Histologie fünf neue CIN2+-Erkrankungen, darunter eine CIN3+, diagnostiziert. Wie in Tabelle 25 werden auch in Tabelle 26 neben der Histologie (Endpunkte CIN2+ und CIN3+), der QG-MPH CIN2+-, QG-MPH CIN3+- und QG-MPH HR-HPV-Diagnostik auch die Ergebnisse der beiden zytologischen Methoden sowie der beiden bereits etablierten DNA-basierten HPV-Tests beschrieben, wobei für die FU-Ergebnisse 95 % KIs berechnet wurden.

Ergebnisse

Tabelle 25: Anzahl der persistierenden und ausgeheilten Infektionen gemäß der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden.

Test	Test positiv bei BL-Untersuchung		Test positiv bei FU-Untersuchung (persistierend)			Test negativ bei FU-Untersuchung (ausgeheilt)		
	n	%	n	%	95 % KI	n	%	95 % KI
QG-MPH CIN2+	104	100	42	40,4	31,0–50,5	62	59,6	49,5–69,0
QG-MPH CIN3+	103	100	41	39,8	30,4–49,9	62	60,2	50,1–69,6
QG-MPH HR-HPV	18	100	4	22,2	7,4–48,1	14	77,8	51,9–92,6
QG-MPH hHR	12	100	3	25,0	6,7–57,2	9	75,0	42,8–93,3
Histologie CIN2+	8	100	1	12,5	0,7–53,3	7*	87,5	46,7–99,3
Histologie CIN3+	5	100	0	0,0	----	5*	100,0	----
PAP	16	100	2	12,5	2,2–39,6	14	87,5	60,4–97,8
LBC	12	100	2	16,7	2,9–49,1	10	83,3	50,9–97,1
HC2	75	100	13	17,3	9,9–28,2	62	82,7	71,8–90,1
PCR	85	100	19	22,4	14,3–32,9	66	77,6	67,1–85,7

BL = Baseline, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, FU = Follow-up, HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, hHR = High HR-HPV, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, KI = Konfidenzintervall, LBC = Liquid-Based Cytology, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology

* Da es bei diesen Frauen keine Indikation für eine Kolposkopie im Follow-up gab, sind diese Zahlen nur Annahmen.

Tabelle 26: Anzahl der Neuerkrankungen und durchgängig unauffälligen Ergebnisse gemäß der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden.

Test	Test negativ bei BL-Untersuchung		Test positiv bei FU-Untersuchung			Test negativ bei FU-Untersuchung (keine Neuerkrankung)		
	n	%	n	%	95 % KI	n	%	95 % KI
QG-MPH CIN2+	395	100	81	20,5	16,7 – 24,9	314	79,5	75,1 – 83,3
QG-MPH CIN3+	396	100	77	19,4	15,7 – 23,8	319	80,6	76,2 – 84,3
QG-MPH HR-HPV	481	100	17	3,5	2,1 – 5,7	464	96,5	94,3 – 97,9
QG-MPH hHR	487	100	10	2,1	1,0 – 3,9	477	97,9	96,1 – 99,0
Histologie CIN2+	491*	100	5	1,0	0,4 – 2,5	486*	99,0	97,5 – 99,6
Histologie CIN3+	494*	100	1	0,2	0,0 – 1,3	493*	99,8	98,7 – 100,0
PAP	436**	100	18	4,1	2,5 – 6,6	418	95,9	93,4 – 97,5
LBC	487	100	8	1,6	0,8 – 3,4	477	98,4	96,6 – 99,2
HC2	424	100	47	11,1	8,3–14,6	377	88,9	85,4 – 91,7
PCR	414	100	35	8,5	6,0 – 11,7	379	91,5	88,3 – 94,0

BL = Baseline, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, FU = Follow-up, HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, hHR = High HR-HPV, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, KI = Konfidenzintervall, LBC = Liquid-Based Cytology, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology

* Da es bei diesen Frauen keine Indikation für eine Kolposkopie im Follow-up gab, sind diese Zahlen nur Annahmen.

** Ursprünglich 464 Baseline-negative; für 28 von diesen liegt allerdings kein PAP-Ergebnis im Follow-up vor

4.4.2 Prognostische Aussagekraft des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests unter Zugrundelegung von Zytologie und etablierten HPV-Tests

Da für die meisten Patientinnen kein histologischer Befund vorliegt, aber bei fast allen Frauen eine zytologische Untersuchung und ein DNA-basierter HPV-Test durchgeführt wurde, wird in diesem Abschnitt zunächst die prognostische Aussagekraft der QG-MPH CIN2+-Diagnostik deskriptiv anhand der zytologischen Ergebnisse und der HR-HPV-Resultate untersucht.

In Tabelle 27 werden die kombinierten BL-Ergebnisse der Zytologie und der QG-MPH CIN2+-Diagnostik mit den FU-Befunden dieser beiden Untersuchungen gekreuzt. Es ist zu beachten, dass Zytologie-positiv bedeutet, dass der PAP- und/oder der Erstbegutachtungs-LBC-Befund auffällig war/waren. Wenn das Ergebnis einer der beiden Untersuchungen fehlt und für die andere Methode ein negatives Ergebnis vorliegt, wurde die Patientin für diese Analyse ausgeschlossen. Von besonderem Interesse sind bei dieser Analyse die Zeilen „Zytologie-positiv, QG-MPH CIN2+-negativ“ sowie „Zytologie-negativ, QG-MPH CIN2+-positiv“, da hier die Unterschiede der beiden Untersuchungsmethoden bezüglich Prognostik aufgezeigt werden. So ist in Spalte „Zytologie-positiv“ zu sehen, dass von insgesamt 24 im FU zytologisch auffälligen Frauen im BL sowohl zwei einen pathologischen Zytologiebefund bei negativer QG-MPH CIN2+-Diagnostik als auch zwei einen pathologischen Befund in der QG-MPH CIN2+-Diagnostik, aber nicht in der Zytologie, hatten. Dagegen zeigen ca. 75,0 % dieser Gruppe im BL für beide Tests ein negatives Ergebnis. Eine mögliche Erklärung ist, dass hier die Infektion erst nach der BL-Untersuchung erfolgt ist. Unter den 430 im FU Zytologie-negativen Frauen wurden 12 im BL zytologisch auffällig und QG-MPH CIN2+-negativ sowie 83 im BL QG-MPH CIN2+-positiv und zytologisch unauffällig befundet. Es ist zu vermuten, dass die 1,6 %, die im BL QG-MPH CIN2+- und Zytologie-positiv und im FU Zytologie-negativ waren, ausgeheilte Infektionen darstellen. In den Spalten „QG-MPH CIN2+-positiv“ und „QG-MPH CIN2+-negativ“ wurden die zugehörigen FU-Ergebnisse der QG-MPH CIN2+-Diagnostik beschrieben.

Die Kontingenzanalyse in Tabelle 28 zeigt die Kreuzung der Kombination aus den BL HR-HPV- und QG-MPH CIN2+-Ergebnissen mit den FU HR-HPV-Resultaten. Dabei gilt eine Patientin als HR-HPV-positiv, wenn sie HC2- und/oder PCR-positiv war. Von den insgesamt 73 im FU HR-HPV-positiven Frauen waren 17 im BL HR-HPV-positiv und QG-MPH CIN2+-negativ und 11 Frauen im BL QG-MPH CIN2+-positiv, jedoch HR-HPV-negativ. Erneut ist anzunehmen, dass es sich bei den 38 im BL HR-HPV- und QG-MPH CIN2+-unauffälligen und im FU HR-HPV-positiven Frauen um tatsächliche Neuinfektionen im FU gehandelt hat. Weiterhin ist zu erkennen, dass von den 426 im FU HR-HPV-negativen Frauen ca. 20 % im BL HR-HPV-positiv und QG-MPH CIN2+-negativ waren und ca. 15 %, d. h. 22 Frauen weniger, in der BL-Untersuchung für die QG-MPH CIN2+-Diagnostik positive und gleichzeitig HR-HPV-negative Befunde hatten. Auch in dieser Kontingenztabelle werden die FU-Ergebnisse der QG-MPH CIN2+-Diagnostik in den beiden hinteren Spalten dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 27: Gegenüberstellung der kombinierten Ergebnisse aus Zytologie und QG-MPH CIN2+-Diagnostik im Baseline mit den Follow-up-Resultaten beider Methoden.

BL-Befunde	FU-Befunde											
	Zytologie* pos.			Zytologie* neg.			QG-MPH CIN2+ pos.			QG-MPH CIN2+ neg.		
	n (24)	%	95 % KI	n (430)	%	95 % KI	n (118)	%	95 % KI	n (364)	%	95 % KI
Zytologie* pos. QG-MPH CIN2+ pos.	2	8,3	1,5–28,5	7	1,6	0,7–3,5	5	4,2	1,6–10,1	4	1,1	0,4–3,0
Zytologie* pos. QG-MPH CIN2+ neg.	2	8,3	1,5–28,5	12	2,8	1,5–5,0	3	2,5	0,7–7,8	12	3,3	1,8–5,8
Zytologie* neg. QG-MPH CIN2+ pos.	2	8,3	1,5–28,5	83	19,3	15,7–23,4	34	28,8	21,0–38,0	56	15,4	11,9–19,6
Zytologie* neg. QG-MPH CIN2+ neg.	18	75,0	52,9–89,4	328	76,3	71,9–80,2	76	64,4	55,0–72,9	292	80,2	75,7–84,1

BL = Baseline, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, FU = Follow-up, KI = Konfidenzintervall, LBC = Liquid-Based Cytology, neg. = Negativ, pos. = Positiv, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology

* Zytologie = Kombination aus PAP und LBC Ergebnis → positiv, wenn eine der beiden Methoden positiv ist

Tabelle 28: Gegenüberstellung der kombinierten Ergebnisse aus HR-HPV- und QG-MPH CIN2+-Diagnostik im Baseline mit den Follow-up-Resultaten beider Methoden.

BL-Befunde	FU-Befunde											
	HR-HPV* pos.			HR-HPV* neg.			QG-MPH CIN2+ pos.			QG-MPH CIN2+ neg.		
	n (73)	%	95% KI	n (426)	%	95% KI	n (123)	%	95% KI	n (376)	%	95% KI
HR-HPV* pos. QG-MPH CIN2+ pos.	7	9,6	4,3–19,3	21	4,9	3,2–7,6	13	10,6	6,0–17,7	15	4,00	2,3–6,6
HR-HPV* pos. QG-MPH CIN2+ neg.	17	23,3	14,5–34,9	87	20,4	16,8–24,6	21	17,1	11,1–25,1	83	22,1	18,1–26,7
HR-HPV* neg. QG-MPH CIN2+ pos.	11	15,1	8,1–25,8	65	15,3	12,0–19,1	29	23,6	16,6–32,2	47	12,5	9,4–16,4
HR-HPV* neg. QG-MPH CIN2+ neg.	38	52,1	40,1–63,8	253	59,4	54,5–64,1	60	48,8	39,7–57,9	231	61,4	56,3–66,3

BL = Baseline, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, FU = Follow-up, HC2 = Diagene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, KI = Konfidenzintervall, neg. = Negativ, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, pos. = Positiv, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology

* HR-HPV = Kombination aus PCR und HC2 Ergebnis → positiv, wenn eine der beiden Methoden positiv ist

4.4.3 Anekdotische Darstellung der prognostischen Aussagekraft des QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Tests in Bezug auf die Histologie anhand von Fallbeschreibungen

Da das Kollektiv für die hier durchgeführten Analysen eine Subpopulation einer Screeningstudie darstellt, ist die Anzahl der Patientinnen mit histologischem Ergebnis naturgemäß sehr gering. Daher wird nachfolgend die Analyse der prognostischen Aussagekraft des QG-MPH bezüglich der Histologie anekdotisch in Fallbeschreibungen aufgezeigt. Hierfür werden alle Patientinnen mit im

BL oder FU CIN2+-Histologie ausführlich beschrieben. Neben der in Kapitel 4.3.1 bereits erwähnten Patientin mit persistierender CIN2+ (Patientin 1) werden die fünf im FU (Patientinnen 2–6) sowie die sieben im BL (Patientinnen 7–13) histologisch CIN2+-positiven Frauen vorgestellt. Darüber hinaus wird auch eine gesunde Teilnehmerin (Patientin 14) inkludiert, die neben Patientin 1 die einzige mit zweimalig durchgeführter Histologie in dieser Subpopulation ist. Bei der in Tabelle 29 rot markierten Patientin 15 handelt es sich um die therapierte und damit von den bisherigen FU-Analysen ausgeschlossene Studienteilnehmerin.

Patientin 1: Neben zytologischen Auffälligkeiten wurden bei dieser Patientin eine HPV 16-Infektion sowie histologisch eine CIN3 detektiert und auch im QG-MPH war sie CIN3+ und HPV 16-positiv. Bei der FU-Untersuchung wurden die gleichen Ergebnisse gefunden, außer, dass bezüglich der LBC mit dem Stadium PAP II sowie bezüglich der Histologie mit der Diagnose CIN2 ein Rückgang der zervikalen Läsion zu verzeichnen war. Im QG-MPH wurde weiterhin eine CIN3+ und eine HPV 16-Infektion gemessen.

Patientinnen 2+4+6: Diese drei Patientinnen wiesen in der BL-Untersuchung sowohl bei den etablierten Screeningmethoden als auch im QG-MPH unauffällige Ergebnisse auf. Im FU waren alle drei Frauen HR-HPV-positiv und bei zwei von ihnen zeigten sich zudem zytologische Auffälligkeiten. Die damit indizierte histologische Untersuchung ergab bei zwei Patientinnen die Diagnose CIN2 und bei einer Patientin die Diagnose CIN3. Der QG-MPH diagnostizierte bei allen drei Studienteilnehmerinnen eine CIN3+, allerdings war nur bei einer von ihnen eine HR-HPV-Infektion messbar. Bei Patientin 6 ist anzumerken, dass für das positive QG-MPH CIN3+-Ergebnis einzig der erhöhte Biomarker p16 verantwortlich ist.

Patientin 3: Bei dieser Teilnehmerin konnten im BL keine zytologischen Auffälligkeiten (fehlendes PAP-Ergebnis, unauffällige LBC) und nur mittels PCR eine HR-HPV-Infektion detektiert werden. Für den QG-MPH wurde zu diesem Zeitpunkt eine HR-HPV-negative CIN3+ verzeichnet. Auch hier war für das QG-MPH CIN3+-Ergebnis einzig der erhöhte Biomarker p16 verantwortlich. Da der HC2 negativ und die Zytologie unauffällig waren, wurde keine histologische Untersuchung vorgenommen. Im FU zeigte sich erneut eine mittels PCR detektierte HPV 52-Infektion und auch mittels HC2 konnte diesmal eine HR-HPV-Infektion festgestellt werden. Das Ergebnis der LBC lautete PAP IIw/IIIk und das des PAP-Abstrichs PAP IVa. In der anschließenden Histologie wurde eine CIN2 diagnostiziert. Der QG-MPH zeigte abermals eine HR-HPV-negative CIN3+. Diesmal waren jedoch neben p16 auch der Biomarker MCM2 und der führende HPV über ihrem jeweiligen Cutoff.

Patientin 5: Die fünfte Fallbeschreibung stellt eine im BL für die etablierten Screeningmethoden unauffällige Patientin vor, bei der folglich keine histologische Abklärung vorgenommen wurde. Für den QG-MPH wurde im BL bereits eine HR-HPV-negative CIN3+ vermerkt. Abermals war nur der Biomarker p16 über dem Cutoff und für die CIN3+-Positivität verantwortlich, während der RS CIN2+ negativ war. Es zeigte sich auch ein erhöhtes ALDH1A1, welches alleine jedoch nicht für einen positiven Karzinomscore ausgereicht hat. Aufgrund einer im FU neu aufgetretenen HPV 16-Infektion wurde trotz unauffälliger Zytologie eine Histologie durchgeführt, bei der die Diagnose CIN2 gestellt wurde. Die QG-MPH-Ergebnisse zeigten dabei erneut eine CIN3+, diesmal allerdings mit einer HPV 16-Infektion und einer Erhöhung mehrerer Biomarker.

Patientinnen 7+12: Histologisch zeigte sich bei diesen beiden Frauen im BL eine CIN2 bzw. CIN3. Diese weiterführende differentialdiagnostische Untersuchung war bei Patientin 7 aufgrund eines positiven HC2-Ergebnisses indiziert, während Patientin 12 vermutlich zu den 5 % gesunden Frauen mit Histologie zählt, da bei ihr alle Screeningergebnisse unauffällig waren. Die QG-MPH-Resultate sind sowohl im BL als auch im FU, genau wie die FU-Befunde der Screeninguntersuchungen, ohne Pathologie, sodass auch keine erneute histologische Untersuchung stattgefunden hat.

Patientinnen 11+13: Die zytologischen Auffälligkeiten von Patientin 11 sowie die HR-HPV-Positivität beider Patientinnen (11+13) konnten mittels Histologie und QG-MPH bestätigt werden, wobei sich bei Patientin 11 zwischen dem QG-MPH und der Histologie Abweichungen im jeweils detektierten Schweregrad der Dysplasie zeigten. So wurde durch den QG-MPH ein erhöhtes Karzinomrisiko (Erhöhung von MCM2, ALDH1A1 und führender HPV) und für die Histologie eine CIN2 diagnostiziert. Das FU konstatierte bei beiden Frauen für alle Untersuchungsmethoden unauffällige Befunde, sodass auch keine erneute histologische Untersuchung durchgeführt wurde.

Patientin 8: Bei dieser im BL zytologisch unauffälligen, HR-HPV positiven und histologisch als CIN3 diagnostizierten Patientin wurde zum gleichen Untersuchungszeitpunkt im QG-MPH ein HR-HPV-negatives Karzinom verzeichnet. Die QG-MPH Diagnose „Karzinom“ ist durch die Erhöhungen der Biomarker MCM2, ALDH1A1 sowie führender HPV bedingt. Die FU-Untersuchungsergebnisse zeigten sich rückläufig, sodass außer einer in der PCR detektierten HR-HPV-Infektion mit zum BL abweichendem Typ kein weiterer pathologischer Befund resultierte. Im QG-MPH lag hier kein Biomarker über dem jeweiligen Cutoff.

Patientin 9: Diese Patientin zeigte in der BL-Untersuchung lediglich eine HC2-HR-HPV-Positivität sowie eine histologisch diagnostizierte CIN2. Ein ähnliches Bild ist auch im FU zu

sehen, nur dass diesmal keine Histologie durchgeführt wurde und mittels QG-MPH ein Karzinom (aufgrund der Erhöhung von MCM2, ALDH1A1 und führendem HPV) und eine HPV 68-Infektion gemessen wurde. Es ist zu erwähnen, dass der Biomarker ALDH1A1 bereits im BL erhöht war, dieser jedoch alleine nicht für einen positiven Karzinomrisikoscore genügt hat.

Patientin 10: Die bei dieser Patientin in der BL-Untersuchung detektierten pathologischen PAP-, HR-HPV- und Histologiebefunde konnten mittels QG-MPH bestätigt werden. Im darauffolgenden FU zeigten sich außer der weiterhin bestehenden HPV 16-Infektion weder in der Zytologie noch im QG-MPH Pathologien. Aus unbekanntem Gründen wurde bei dieser Patientin im FU trotz Indikation keine histologische Untersuchung durchgeführt.

Patientin 14: Aufgrund unauffälliger BL- und FU-Histologie wurde diese Patientin als gesund bezeichnet. Bei ihr waren alle BL-Ergebnisse inklusive QG-MPH-Resultate unauffällig. In der FU-Untersuchung waren erneut größtenteils Normalbefunde zu verzeichnen. Lediglich der HC2 zeigte eine HR-HPV-Positivität an und der QG-MPH war im Risikoscore CIN2+ positiv (Erhöhung von p16 und führendem HPV) bei unauffälligem HR-HPV-Status.

Patientin 15: Für diese Patientin wurde bei der BL-Untersuchung in der LBC der Befund PAP IVa, eine HR-HPV-Infektion mit dem Genotyp 16 sowie histologisch eine CIN3 verzeichnet. Auch im QG-MPH zeigte sich im BL eine CIN3+ mit HPV 16-Infektion. Die auf die BL-Untersuchung folgende Therapie erklärt die durchweg unauffälligen FU-Befunde dieser Patientin.

Da möglicherweise bestimmte Biomarker eine entscheidende Rolle für die prognostische Aussagekraft der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik spielen, werden diese nun einzeln betrachtet (s. Abbildung 24). Hierzu werden neben den zwei Frauen mit Histologie in BL und FU nur Fallbeschreibungen ausgewählt, die bei fehlender zweiter Histologie in allen Screeningtests unauffällig waren. Durch diese Anforderung soll die Wahrscheinlichkeit einer unauffälligen Histologie auf eine breitere Basis gestellt werden. So wurden aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse die Patientinnen 3, 8, 9 und 10 nicht mit einbezogen und es verbleiben für die Analyse der Biomarker Patientin 1 („Persistierend“), die Patientinnen 2, 4 - 6 („Neuerkrankung“), die Patientinnen 7, 11 -13 („Ausgeheilt“) und Patientin 14 („Gesund“). Wenn es um die Vorhersagekraft zur Entwicklung einer Erkrankung geht, ist es wichtig, dass die Vergleichsgruppen gemäß den etablierten Tests das gleiche Anfangsstadium mit einer möglicherweise abweichenden Entwicklung im FU aufweisen. Deshalb werden jeweils die Gruppen „Persistierend“ und „Ausgeheilt“, beide im BL auffällig, sowie die Gruppen „Gesund“ und „Neuerkrankung“, beide im BL unauffällig, gegenübergestellt.

Ergebnisse

Im erstgenannten Vergleich fällt auf, dass v. a. bei den Patientinnen 11 und 13 sowie größtenteils auch bei Patientin 12 aus der Gruppe „Ausgeheilt“ p16, Stathmin und MCM2 deutlich stärker exprimiert waren als bei der persistierenden Patientin. Bei den Patientinnen 7 und 12 muss angemerkt werden, dass diese zum Zeitpunkt der histologischen CIN2+-Erkrankung sowohl beim QG-MPH als auch bei fast allen anderen Screeninguntersuchungen unauffällig waren und somit das histologische Resultat mit Vorsicht zu betrachten ist. Für die Karzinommarker ALDH1A1, BIRC5 und TERT traten abgesehen von Patientin 11 in beiden Gruppen keine wesentlichen Erhöhungen auf. Dass die Splicemarker nur bei der persistierenden Patientin erhöht waren, lässt sich dadurch erklären, dass nur bei dieser eine HPV 16-Infektion nachgewiesen wurde und nur für diesen Genotyp Splicemarker in die RS einbezogen sind.

In der zweiten Gegenüberstellung zeigt sich für die Gruppe „Neuerkrankung“ im Gegensatz zur gesunden Patientin im BL eine größtenteils einheitliche Erhöhung von p16, Stathmin und MCM2. Dabei ist für p16 ein eindeutiger Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Sinne von höherer Expression bei Neuerkrankungen zu verzeichnen, während dieser bei MCM2 nur sehr gering ausfällt. Für den Biomarker ALDH1A1 zeigt Patientin 5 eine deutliche und Patientin 6 eine leichte Erhöhung. Alle weiteren Biomarker waren bei beiden Gruppen unauffällig.

Ergebnisse

Tabelle 29: Fallbeschreibungen von Patientinnen mit auffälliger Histologie (CIN2+) im Baseline oder Follow-up sowie von Patientinnen mit histologischer Untersuchung zu beiden Zeitpunkten.

	Baseline-Ergebnisse							Follow-up-Ergebnisse						
	MARZY					QG-MPH		MARZY					QG-MPH	
	PAP	LBC	HC2	PCR	Histologie	Dysplasie	HR-HPV	PAP	LBC	HC2	PCR	Histologie	Dysplasie	HR-HPV
Patientin 1 (Persistierend)	PAP IIID	PAP IIID	positiv	HPV 16	CIN3	CIN3+	HPV 16	PAP IIID	PAP II	positiv	HPV 16	CIN2	CIN3+	HPV 16
Patientin 2 (Neuerkrankung)	PAP II	PAP II	negativ	negativ	Fehlt	negativ	negativ	PAP IIID	PAP IIID	positiv	HPV 31	CIN2	CIN3+	HPV 31
Patientin 3 (Neuerkrankung)	Fehlt	PAP II	negativ	HPV 52	Fehlt	CIN3+	negativ	PAP IVa	PAP IIk	positiv	HPV 52	CIN2	CIN3+	negativ
Patientin 4 (Neuerkrankung)	PAP II	PAP II	negativ	negativ	Fehlt	negativ	negativ	PAP IIID	PAP IIID	positiv	HPV 16 +45	CIN2	CIN3+	negativ
Patientin 5 (Neuerkrankung)	PAP II	PAP II	negativ	negativ	Fehlt	CIN3+	negativ	PAP I/II	PAP II	positiv	HPV 16	CIN2	CIN3+	HPV 16
Patientin 6 (Neuerkrankung)	PAP II	PAP II	negativ	negativ	Fehlt	negativ	negativ	Fehlt	PAP II	positiv	HPV 58	CIN3	CIN3+	negativ
Patientin 7 (Ausgeheilt)	PAP II	PAP II	positiv	negativ	CIN2	negativ	negativ	PAP II	PAP II	negativ	negativ	Fehlt	negativ	negativ
Patientin 8 (Ausgeheilt)	PAP II	PAP II	positiv	HPV 56	CIN3	CxCa	negativ	PAP II	PAP II	negativ	HPV 66	Fehlt	negativ	negativ
Patientin 9 (Ausgeheilt)	PAP II	PAP II	positiv	negativ	CIN2	negativ	negativ	PAP I/II	PAP II	positiv	negativ	Fehlt	CxCa	HPV 68
Patientin 10 (Ausgeheilt)	PAP IIID	PAP II	positiv	HPV 16	CIN3	CIN3+	HPV 16	PAP II	PAP II	positiv	HPV 16	Fehlt	negativ	negativ
Patientin 11 (Ausgeheilt)	PAP IIID	PAP II	positiv	HPV 52	CIN2	CxCa	HPV 52	PAP II	PAP II	negativ	negativ	Fehlt	negativ	negativ
Patientin 12 (Ausgeheilt)	PAP II	PAP II	negativ	negativ	CIN3	negativ	negativ	PAP II	PAP II	negativ	negativ	Fehlt	negativ	negativ
Patientin 13 (Ausgeheilt)	PAP II	PAP II	positiv	HPV 31	CIN3	CIN3+	HPV 31	PAP II	PAP II	negativ	negativ	Fehlt	negativ	negativ
Patientin 14 (Gesund)	PAP I	PAP II	negativ	negativ	Normal	negativ	negativ	PAP I/II	PAP II	positiv	negativ	Normal	CIN2+	negativ
Patientin 15 (Therapiert)	PAP II	PAP IVa	positiv	HPV 16	CIN3	CIN3+	HPV 16	PAP I/II	PAP II	negativ	negativ	Fehlt	negativ	negativ

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CxCa = Cervical Cancer, HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, HR-HPV = High-Risk-HPV, LBC = Liquid-Based Cytology, PCR = GP5+/6+ RLB PCR, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology

Ergebnisse

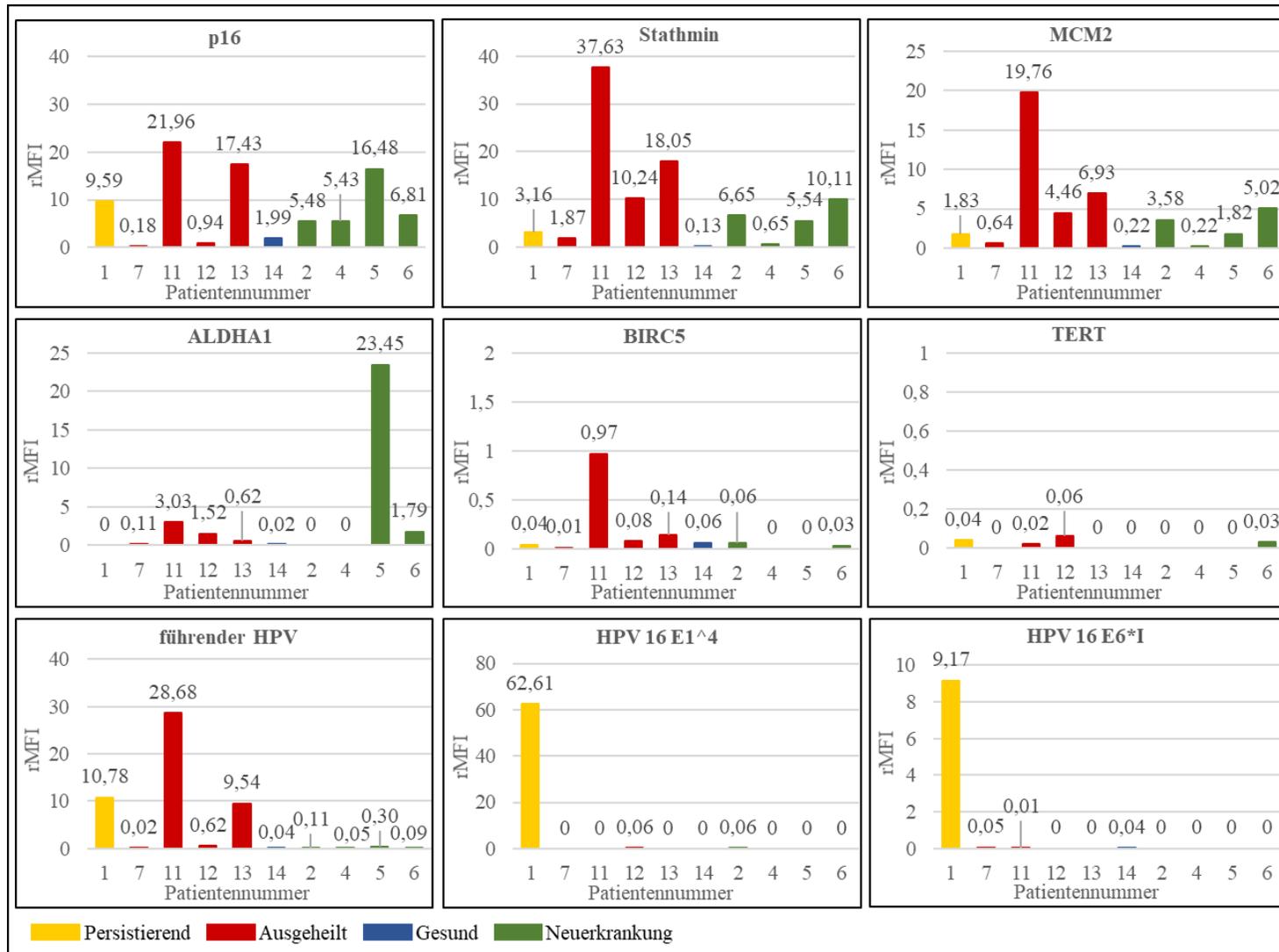


Abbildung 24: Darstellung der Biomarkerexpression bei der Baseline-Untersuchung für eine Auswahl an Fallbeschreibungen. (Auswahl: Frauen mit Histologie im Baseline und Follow-up plus Frauen, die bei fehlender zweiter Histologie in allen Screeningtests unauffällig waren. ALDH1A1 = Aldehyde Dehydrogenase 1 A1, HPV = Humanes Papillomvirus, MCM = Minichromosome Maintenance, rMFI = Relativierte mittlere Fluoreszenzintensität, TERT = Telomerase-Reverse-Transkriptase)

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, den QG-MPH-Test mit seiner HR-HPV-Diagnostik und seinen mithilfe von Biomarkern abgeleiteten RS, die eine Dysplasie-Diagnostik ermöglichen, an einer ausgewählten Subpopulation einer Screeningpopulation hinsichtlich der Anwendbarkeit in der Zervixkarzinomvorsorge zu validieren sowie bezüglich seiner prognostischen Aussagekraft zu untersuchen. Dies ist von großer Bedeutung, da das seit Januar 2020 in Deutschland neu eingeführte Screeningprogramm zur Zervixkarzinomvorsorge zwar durch die zusätzliche HPV-Untersuchung seine Sens. erhöht, gleichzeitig aber zu einem Verlust an Spez. führt. In diesem Kapitel wird die Kernfrage der Arbeit, ob der QG-MPH eine mögliche Ergänzung oder sogar eine Alternative zum aktuellen Vorsorgeprogramm darstellt, diskutiert.

Zu Beginn der Diskussion werden die Ergebnisse der in Kapitel 2.3 formulierten Hypothesen bewertet (Kapitel 5.1) und anschließend in den Kontext der bestehenden Literatur eingeordnet (Kapitel 5.2). Dazu werden diese zuerst mit den Ergebnissen der Entwicklungsarbeit für die HR-HPV-Cutoffs und RS von M. Basten (Kapitel 5.2.1) und anschließend mit den Resultaten weiterer Studien zum Zervixkarzinomscreening verglichen (Kapitel 5.2.2). Darüber hinaus wird ein weiterführender wissenschaftlicher Kontext mit anderen potentiellen Methoden zur Zervixkarzinomvorsorge aufgezeigt (Kapitel 5.3) sowie der QG-MPH-Test als Screeningalternative diskutiert (5.4). Zum Abschluss der Diskussion werden die Limitationen (Kapitel 5.5) sowie das Fazit der Arbeit mit Ausblick auf die weitere Entwicklung des QG-MPH-Tests im Rahmen der Zervixkarzinomvorsorge (Kapitel 5.6) vorgestellt.

5.1 Hypothesenbezogene Ergebnisdiskussion

„Für die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik finden wir eine gute Übereinstimmung (nach Cohens Kappa (κ) und Konkordanz) mit den etablierten DNA-basierten HPV-Tests.“

In dieser Arbeit wurde beim Vergleich der HR-HPV-Gesamtauswertung zwischen der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik und der PCR eine Konkordanz von 85,3 % und ein κ von 0,27 sowie zwischen der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik und dem HC2 eine Konkordanz von 87,0 % und ein κ von 0,29 verzeichnet. Die drei HR-HPV-Tests detektieren standardmäßig unterschiedlich viele HR-HPV-Genotypen (QG-MPH: 18, PCR: 14 und HC2: 13). Auch wenn man diese in allen drei HR-HPV-Tests auf die 13 von der WHO als „High-Risk“ definierten Genotypen begrenzt, kommt man zu ähnlichen Ergebnissen (s. Kapitel 4.2). Bei der Gegenüberstellung der einzelnen HR-HPV-Genotypen bzw. -Gruppen der QG-MPH HR-HPV Diagnostik und denen der PCR ergab sich ein

differenziertes Bild. So wurde für die HPV-Genotypen 51 und 59 mit einem Wert von 0,67 die beste Übereinstimmung nach κ verzeichnet, während für die Genotypen 58 und 68 ein κ von 0 erzielt wurde. Für alle vier Typen wurde dabei eine Konkordanz $\geq 99\%$ vermerkt. Da für manche HR-HPV-Genotypen lediglich in einer der beiden Methoden ein positiver Fall zu verzeichnen war, konnte für diese kein κ berechnet werden.

Die relativ hohen Konkordanzen und gleichzeitig niedrigen κ -Werte lassen sich mit der geringen Anzahl HR-HPV-positiver Proben begründen, denn die hohe Übereinstimmung HR-HPV-negativer Frauen führt zwar zu einer hohen Konkordanz, aber gleichzeitig auch zu einer hohen Zufallswahrscheinlichkeit, welche in die Berechnungen von κ eingeht. Somit ist die Aussagekraft von Konkordanz und κ bezüglich der Übereinstimmung der Methoden in dieser Arbeit eingeschränkt. Dies spiegelt sich auch in der Gegenüberstellung der beiden bereits etablierten Verfahren, HC2 und PCR (GP5+/6+ RLB PCR), wider. Diese erreichte gegenüber den Vergleichen mit der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik ein sogar leicht geringeres κ von 0,26 bei einer Konkordanz von 79,6 %. Im Vergleich hierzu konstatierten de Thurah et al. zwischen dem HC2 und dem GP5+/6+ PCR Enzymimmunoassay in einer in ihrer Metaanalyse eingeschlossenen Studie ein κ von 0,74 und in einer weiteren ein κ von 0,59.¹³¹ Außerdem muss bedacht werden, dass die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik auf einer Detektion von RNA-Sequenzen und nicht wie die anderen beiden HPV-Tests auf DNA basiert. Erstere werden ausschließlich bei aktiven Transkriptionen nachgewiesen, sodass die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik nur auf klinisch relevante und nicht auf transiente Infektionen anspricht. Eine 100 %-ige Übereinstimmung der Ergebnisse ist somit ohnehin nicht zu erwarten und auch nicht Ziel der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik. Auch wenn die Aussagekraft dieser Analyse eingeschränkt ist, zeigt die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik insgesamt dennoch eine bessere Übereinstimmung mit zwei bereits für das Primärscreening zugelassenen und etablierten Verfahren als diese untereinander. Zur Optimierung der Methode sollten aber eventuell die Cutoffs bezüglich der HR-HPV-Positivität der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik nachjustiert werden.

Da in den Leitlinien nicht die Übereinstimmung der Ergebnisse der HPV-Tests, sondern die Detektion von nicht transienten HPV-Infektionen im Vordergrund steht, zählen die Sens. und die Spez. für den histologischen Endpunkt CIN2+ zu den wichtigsten Kriterien für die Etablierung eines HPV-basierten Screeningtests. Hierbei muss die entsprechende Methode mindestens 90 % der Sens. bzw. 98 % der Spez. einer der beiden als Goldstandard definierten HPV-Tests erreichen.²¹ Dies war für die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik jedoch nicht der Fall, denn diese zeigt für den histologischen Endpunkt CIN2+ zwar eine deutlich höhere Spez., aber nur 63 % (adjustiert

62 %) der Sens. des HC2. Da somit die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik alleine nicht ausreicht, um alle relevanten Infektionen zu erkennen, soll sie zur Verbesserung der Detektion um die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik, basierend auf der Quantifizierung von Biomarkern und daraus berechneten RS, ergänzt werden.

„Mit der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik kann eine bessere Sens. als mit der Zytologie (> 50 %) erreicht werden.“

Auch wenn die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik die Kriterien der Leitlinien für einen HPV-basierten Screeningtest nicht erfüllt, liegt ihre Sens. in dieser Arbeit deutlich über der der Zytologie. So erreichte der PAP für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ eine Sens. von je 33 % (adjustiert 14 % bzw. 11 %). Weder die LBC, die eine Sens. von 22 % (adjustiert 9 %) für den Endpunkt CIN2+ und 33 % (adjustiert 11 %) für den Endpunkt CIN3+ erzielte, noch die Erhöhung des Cutoffs zu PAP IID zeigen bessere Ergebnisse. Somit ist die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik mit 56 % (adjustiert 23 %) für den Endpunkt CIN2+ und 67 % (adjustiert 21 %) für den Endpunkt CIN3+ deutlich sensitiver als die Zytologie. Hinzu kommt, dass die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik dabei eine verglichen mit der Zytologie ähnliche und damit sehr gute Spez. von 87 % bzw. 85 % (adjustiert 97 %) erreicht. Auch die in der Literatur berichteten Sens. für die Zytologie sind mit durchschnittlich 53 % (ohne Adjustierung) für CIN2+ bei starken regionalen Schwankungen etwas niedriger als die in dieser Arbeit ermittelte rohe Sens. der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik.⁶⁵ Die niedrigen adjustierten Sens. in dieser Arbeit sind vermutlich auf die fehlende Repräsentanz der verwendeten Subpopulation (Fall-Kontroll-Studie) aus dem ursprünglichen MARZY-Kollektiv zurückzuführen. Weitere Daten und Diskussionen in Bezug auf die Zytologie folgen ausführlich in Kapitel 5.2.2.

„Der QG-MPH kann mithilfe von Risikoscores eine bessere Aussage bezüglich des aktuellen Krankheitsstadiums treffen als etablierte DNA-basierte HPV-Tests, die Zytologie oder das Cotesting.“

Zur Bewertung der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik bzw. der RS werden die Ergebnisse der Sens.- und Spez.- Analyse aus Kapitel 4.3 herangezogen. Dabei zeigt die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik bei Betrachtung der Rohwerte für die histologischen Endpunkte CIN2+ und CIN3+ im Vergleich zur Zytologie eine signifikant höhere Sens. bei vergleichbarer Spez. Auch nach Herausrechnen des Verifikationsbias ergeben sich vergleichbare Ergebnisse, abgesehen von einer nicht signifikant höheren Spez. der Zytologie im Vergleich zur QG-MPH Dysplasie-Diagnostik und einer fehlenden

Signifikanz der höheren Sens. der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik gegenüber dem PAP sowie gegenüber der LBC für den histologischen Endpunkt CIN3+. Weiterhin fällt auf, dass für die Zytologie die Erhöhung des Cutoffs zu PAP IIID zu einem Anstieg der Spez. bei gleichbleibender Sens. führt. Dabei ist jedoch lediglich der Unterschied zwischen der rohen Spez. der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik und der des PAP signifikant.

Beim Vergleich mit dem HC2 wurde für die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik zwar eine nicht signifikant niedrigere Sens. bezüglich des histologischen Endpunkts CIN2+ bilanziert, für die klinisch und v. a. therapeutisch relevanten CIN3+ jedoch erreichen beide Tests die gleiche Sens. Die PCR zeigt für beide histologischen Endpunkte eine identische Sens. wie die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik. Beim Blick auf die Rohwerte erweist sich letztere sowohl für den histologischen Endpunkt CIN2+ als auch CIN3+ signifikant spezifischer als die beiden etablierten HPV-Tests. Die Adjustierung führt hierbei zu einer Annäherung der Spez. und damit zum Verlust des signifikanten Unterschieds. Betrachtet man nun die Kriterien der Leitlinien zur Etablierung eines HPV-basierten Screeningtests erneut, erreicht die QG-MPH CIN2+-Diagnostik bei der rohen Spez. des histologischen Endpunkts CIN2+ genau wie die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik bei der rohen und adjustierten Spez. des histologischen Endpunkts CIN2+ die geforderten 98 % der rohen bzw. adjustierten Spez. des HC2. Die QG-MPH CIN2+-Diagnostik zeigt bei der adjustierten Spez. für den Endpunkt CIN 2+ 97,7% der adjustierten Spez. des HC2 und erfüllt somit auch hier fast das geforderte Kriterium. Auch wenn die QG-MPH CIN2+-Diagnostik für den histologischen Endpunkt CIN2+ nur 75 % (adjustiert 73 %) der Sens. des HC2 verzeichnet, zeigt die QG-MPH CIN3+-Diagnostik für den histologischen Endpunkt CIN3+ 100 % (adjustiert 100 %) der Sens. bei > 100 % (adjustiert 100 %) der Spez. des HC2. Damit kann resümiert werden, dass die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik für den histologischen Endpunkt CIN 2+ nicht ganz, für den histologischen Endpunkt CIN3+ jedoch klar die Kriterien der Leitlinien erfüllen würde.²¹

Die schon lange bekannte, sehr niedrige Sens. der Zytologie hat dazu geführt, dass seit Januar 2020 alle Frauen ab dem 35. Lebensjahr zu einem sogenannten Cotesting eingeladen werden, einer Erweiterung der bis dahin alleinigen zytologischen Untersuchung um einen HPV-Test.⁶⁶ Beim Vergleich der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik mit den Cotesting-Varianten – in dieser Arbeit sind dies vier mögliche Kombinationen der zwei DNA-basierten HPV-Tests mit den zwei zytologischen Untersuchungsmethoden – zeigen nur die beiden Varianten, die den HC2 inkludieren, für den histologischen Endpunkt CIN2+ eine deutlich höhere Sens. Alle anderen Sens. sind nahezu identisch. Während sich die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik hinsichtlich der Rohwerte erneut als signifikant spezifischer darstellt, sind auch hier die adjustierten Spez. für die

QG-MPH Dysplasie-Diagnostik und die vier Cotesting-Varianten nahezu gleich hoch. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass das Cotesting zwar die Sens. der Zytologie verbessert, aber gleichzeitig auch die Spez. senkt und dadurch womöglich zur Überdiagnostik von CIN2+-Erkrankungen führt.

Für die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik kann eine nur teilweise niedrigere Sens. (unterschiedliche je nach HPV-Test und Cotesting-Variante) als für die etablierten HPV-Tests und die Cotesting-Varianten, aber gleichzeitig eine deutlich höhere Sens. als für die Zytologie beobachtet werden. Darüber hinaus wurde eine zwar großteils niedrigere Spez. als für die Zytologie, aber eine teilweise leicht höhere Spez. als für die etablierten HPV-Tests und die Cotesting-Varianten festgestellt. Somit liefert die Kombination von Sens. und Spez. der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik für die Krankheitsstadien CIN2+ und CIN3+ eine zuverlässigere Diagnostik verglichen mit den anderen Methoden. Dabei ist zu betonen, dass die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik in dieser Arbeit als einziger Test bei Betrachtung der Rohwerte eine bessere Kombination von hoher Sens. und hoher Spez. (jeweils > 80 %) für die Diagnose CIN3+ liefert als der derzeitige Screeningstandard. Auch hier ist zu vermerken, dass die generell niedrigen adjustierten Sens. in dieser Arbeit auf eine fehlende Repräsentanz der verwendeten Subpopulation zurückgeführt werden können.

In der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass die Ergebnisse für QG-MPH CIN2+ und QG-MPH CIN3+ identisch sind. Dies liegt daran, dass der RS CIN3+ immer positiv war, wenn die Probe für den RS CIN2+ positiv war und teilweise sogar auch, wenn die Probe nicht RS CIN2+ positiv war. Da eine Probe als QG-MPH CIN2+-positiv gezählt wird, wenn entweder der RS CIN2+ und/oder der RS CIN3+ und/oder der RS CxCa positiv ist/sind und eine Probe als QG-MPH CIN3+ gilt, wenn der RS CIN3+ und/oder der RS CxCa positiv ist/sind, ergibt sich bei häufiger RS CIN3+-Positivität auch immer eine QG-MPH CIN2+-Positivität und damit diese identischen Gesamtergebnisse. Für die Vielzahl der positiven RS CIN3+-Ergebnisse ist in dieser Arbeit häufig einzig der Biomarker p16 verantwortlich. Aufgrund im Studienkollektiv dieser Arbeit fehlender Fälle mit histologisch diagnostiziertem Karzinom kann die Aussagekraft der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik hinsichtlich dieses Krankheitsstadiums nicht validiert werden.

„Der QG-MPH kann mithilfe von Risikoscores eine Aussage bezüglich des Entartungsrisikos machen und damit der Triagierung auffälliger Patientinnen im Screening dienen.“

Zur Beurteilung der prognostischen Aussagekraft der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik dienen die Analysen aus Kapitel 4.4. Die Kreuzung der kombinierten BL-QG-MPH CIN2+- und BL-Zytologie-Ergebnisse mit den zytologischen FU-Resultaten in Kapitel 4.4.2 deutet auf eine

ähnliche prognostische Sens. der QG-MPH CIN2+-Diagnostik wie bei der kombinierten PAP- und LBC-Zytologie hin. So wurden von den im FU zytologisch auffälligen Frauen im BL gleich viele Patientinnen mittels QG-MPH CIN2+-Diagnostik wie mittels Zytologie bereits detektiert. Die Auswertung der 430 im FU zytologisch negativen Frauen lässt eine höhere prognostische Spez. der Zytologie vermuten, denn sie bewertet in dieser Gruppe im BL 71 Patientinnen mehr negativ als die QG-MPH CIN2+-Diagnostik. Die Kreuzung der kombinierten BL-QG-MPH CIN2+- und BL-HR-HPV-Ergebnisse mit den FU-HR-HPV-Resultaten liefert Andeutungen dafür, dass sich die prognostischen Ergebnisse ähnlich wie die Querschnittsresultate darstellen. Für die HR-HPV-Ergebnisse wurde die Kombination aus HC2- und PCR-Resultaten herangezogen. Diese haben von den 73 im FU HR-HPV-positiven Frauen im BL 6 Frauen mehr positiv eingestuft als die QG-MPH CIN2+-Diagnostik, was für eine höhere prognostische Sens. der HR-HPV-Tests spricht. Hierbei muss allerdings erneut auf das mögliche Bestehen von transienten und somit klinisch nicht relevanten Infektionen hingewiesen werden. Dagegen zeigen die weiteren Beobachtungen eine tendenziell höhere prognostische Spez. der QG-MPH CIN2+-Diagnostik, da im BL beim HR-HPV-Test mehr Frauen falsch positiv hinsichtlich der FU-HR-HPV-Ergebnisse bewertet wurden als bei der QG-MPH CIN2+-Diagnostik. Insgesamt sind diese Analysen nur grobe Richtwerte, da hier das zwei bis drei Jahre später entstandene FU-Ergebnis der Zytologie bzw. der HR-HPV-Tests für die prognostische Auswertung der BL-Ergebnisse zugrunde gelegt wird, unabhängig von in der Zwischenzeit stattgefundenener Neuerkrankungen oder Ausheilungen. Hinzu kommt, dass weder die Zytologie noch die DNA-basierten HPV-Tests den Goldstandard zur Diagnostik des Zervixkarzinoms darstellen, sondern die histologische Verifikation.

Daher wurde in allen weiteren Analysen die Histologie als Referenz herangezogen. Aufgrund der geringen Fallzahl an Frauen mit histologischer Untersuchung im BL und im FU – wie es in einer Subpopulation einer Screeningstudie dieser Größe nicht anders zu erwarten ist – können in dieser Arbeit bezüglich der Prognostik keine statistischen Auswertungen, sondern nur Fallbeschreibungen dargestellt werden. Hierfür wurden neben den zwei Frauen, die sowohl im BL als auch im FU eine histologische Untersuchung hatten, alle im BL oder FU histologisch CIN2+-befundeten Frauen ausgewählt. Die Analyse der Fallbeschreibungen zeigt, dass von den fünf „Neuerkrankungen“ (BL Histologie: „negativ“, FU Histologie: CIN2+) zwei (Patientinnen 3 und 5) bereits im BL als QG-MPH CIN3+ diagnostiziert wurden. Nur bei einer dieser Patientinnen wurde zu diesem Zeitpunkt auch in der PCR bereits ein positives Ergebnis verzeichnet. Man kann vermuten, dass es hier nach dem Eindringen des Virus aus noch unbekanntem Gründen zu einer Erhöhung der Biomarker gekommen ist, bevor die Viruslast die Cutoffs der etablierten HPV-Tests

überschritten hat. Es ist auch denkbar, dass eine bestimmte Biomarkerkonstellation, etwa verursacht durch andere Infektionen (z. B. Chlamydien), möglicherweise die Etablierung und Entartung einer HR-HPV-Infektion begünstigen kann. Weiterhin könnte ein nicht berücksichtigter HPV-Genotyp (z. B. HPV 68a oder ein Low-Risk Genotyp) für die fehlende Detektion in den DNA-basierten HPV-Tests ursächlich sein. Die Tatsache, dass keine HR-HPV-Infektion mittels QG-MPH HR-HPV-Diagnostik gefunden wurde, kann außerdem durch eine verspätete, erst während der aktiven Transkription beginnenden Bildung von Virus-mRNA erklärt werden. Eine weitere mögliche Erklärung der Ergebnisse ist, dass die Cutoffs für die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik zu sensitiv eingestellt sind und es sich hier um falsch positive QG-MPH Dysplasie-Diagnosen handelt. Bei der Betrachtung der sieben Frauen der Gruppe „Ausgeheilt“ konnte konstatiert werden, dass drei (Patientinnen 7, 9, 12) mittels QG-MPH Dysplasie-Diagnostik bereits im BL als gesund eingestuft wurden. Da bei diesen allerdings in fast allen anderen BL-Screeningtests – abgesehen vom HC2 – ebenfalls keine Auffälligkeiten beobachtet wurden, besteht auch die Möglichkeit von fehlerhaften histologischen Beurteilungen. Die Qualität der histologischen Untersuchung wird im nachfolgenden Kapitel 5.3 noch ausführlicher thematisiert. Die bereits erwähnte Patientin 9 wurde im FU mittels QG-MPH als Karzinom-positiv bewertet, obwohl außer dem HC2 alle anderen Screeningbefunde bei fehlender Histologie unauffällig waren. Eine ähnliche Konstellation zeigt auch Patientin 14 in ihrem FU. Diese beiden Ergebnisse könnten entweder eine bereits mittels QG-MPH Dysplasie-Diagnostik detektierte „Neuerkrankung“ andeuten oder einen falsch positiven Befund darstellen, was durch ein weiteres FU abgeklärt werden müsste. Bei den Patientinnen 8 und 11 muss die Korrektheit der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik zwangsläufig in Frage gestellt werden, denn eine spontane Ausheilung eines Karzinoms, wie es hier laut QG-MPH Dysplasie-Diagnostik der Fall sein soll, ist ohne therapeutische Maßnahmen nicht anzunehmen. Bei der weiteren Analyse der Gruppe „Ausgeheilt“ wurde für die Patientinnen 10 und 13 eine Übereinstimmung auffälliger BL- und unauffälliger FU-Ergebnisse der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik und der Histologie beobachtet, was für eine tatsächliche Ausheilung der Infektionen spricht. Insgesamt deutet die Auswertung der Fallbeschreibungen eine ernstzunehmende prognostische Aussagekraft der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik an, auch wenn der Abstand zum FU von zwei bis drei Jahren die Wahrscheinlichkeit tatsächlich stattgefundener Neuerkrankungen bzw. Ausheilungen erhöht und damit die Aussagekraft deutlich einschränkt. In solchen Fällen kann aus den BL-Untersuchungen heraus der weitere Verlauf noch nicht prognostiziert werden. Besonders die Fälle 8 und 11 offenbaren allerdings auch einen weiterhin bestehenden Verbesserungsbedarf, gegebenenfalls durch Erhöhung der Cutoffs, um falsch positive Detektionen der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik zu

verringern. In dieser Arbeit erlauben die geringe Fallzahl und das größtenteils fehlende zweite histologische Untersuchungsergebnis jedoch ohnehin keine allgemeingültige Aussage.

Zur Untersuchung der prognostischen Aussagekraft der einzelnen Biomarker wurden die Gruppen „Persistierend“ (Patientin 1) und „Ausgeheilt“ (Patientinnen 7, 11 - 13) sowie „Gesund“ (Patientin 14) und „Neuerkrankung“ (Patientinnen 2, 4 - 6) gegenübergestellt. Bei den Gruppen „Ausgeheilt“ und „Neuerkrankung“ liegt das Hauptaugenmerk auf den Ergebnissen der Patientinnen 11 und 13 bzw. 2 und 4, da nur diese neben der histologischen Auffälligkeit auch pathologische Befunde in der Zytologie und einem der beiden etablierten HPV-Tests zeigen. Die dadurch bedingte höhere Übereinstimmung mit den Screeningbefunden stellt deren histologische Ergebnisse auf eine breitere Basis. Die Patientinnen 11 und 13 der Gruppe „Ausgeheilt“ erzielten im Vergleich zu Patientin 1 der Gruppe „Persistierend“ für die Biomarker p16, Stathmin und MCM2 höhere Werte. Die Bedeutung dieser Biomarker für die Bestimmung des Progressionsrisikos kann allerdings nur anhand von Frauen mit einem persistierenden oder progredierenden CIN-Stadium bestimmt werden. Solche Fälle sind in diesem Kollektiv nicht vorhanden, sodass es hierfür einer weiteren Studie bedarf. Dass die Patientin der Gruppe „Persistierend“ im Gegensatz zu denen der Gruppe „Ausgeheilt“ höhere Splicemarker aufweist, liegt daran, dass nur bei ihr eine HPV 16-Infektion detektiert wurde. Da die vier „Neuerkrankungen“ im Vergleich zur Gruppe „Gesund“ größtenteils höhere Werte für die Biomarker p16, Stathmin und MCM2 aufzeigen, sollten diese drei Marker genauer auf ihr prognostisches Potential bezüglich Neuerkrankungen untersucht werden. Die Frauen der Gruppe „Neuerkrankung“ waren im BL HR-HPV-negativ, was darauf hindeuten könnte, dass durch die genannten Biomarkererhöhungen eine erhöhte Suszeptibilität für HPV-Infektionen und -Persistenzen gegeben ist. Dabei ist insbesondere der Marker p16 mit dem größten Unterschied zwischen den beiden Gruppen hervorzuheben. Die Karzinommarker (ALDH1A1, TERT und BIRC5) zeigen keine relevanten Auffälligkeiten, was aufgrund fehlender Karzinompatientinnen in dieser Studie auch zu erwarten war. Dadurch kann allerdings über das prognostische Potential dieser Marker keine Aussage getroffen werden. Es muss generell noch einmal darauf hingewiesen werden, dass es sich bei dieser Analyse nur um Einzelfalldarstellungen handelt, die Hinweise geben, aber keine sicheren Ergebnisse liefern.

5.2 Literaturbezogene Ergebnisinterpretation

5.2.1 Vergleich mit den Ergebnissen der Entwicklungsstudie

Die in dieser Arbeit für die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik verwendeten HR-HPV-Cutoffs und die für die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik benutzten RS wurden im Rahmen der Dissertation von

M. Basten anhand einer Referral-Population (Dysplasiesprechstundenpatientinnen) mittels ROC-Analysen und logistischen Regressionen berechnet. Die Ergebnisse dieser Entwicklungsstudie werden nachfolgend den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen gegenübergestellt.¹¹⁸

Die Entwicklungsstudie zeigte zwischen der HR-HPV-Gesamtauswertung der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik und der des Multiplex Genotyping Assays (MPG) eine Konkordanz von 76,8 % (1077/1403) und ein κ von 0,49. Um einheitliche Voraussetzungen zu schaffen, wurden für beide Tests die gleichen 14 HR-HPV-Genotypen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68 berücksichtigt. In der MABE-Studie wurde zwischen der QG-MPH HR-HPV-Diagnostik und der PCR mit 85,3 % (450/524) eine höhere Konkordanz, aber auch ein deutlich niedrigeres κ von 0,27 erreicht. Wie bereits erwähnt, wurden als PCR-Ergebnisse die der GP5+/6+ RLB PCR gewählt, einer mit dem MPG vergleichbaren Methode. Im Gegensatz zur Entwicklungsstudie wurden in der vorliegenden Arbeit für die zu vergleichenden Methoden die 13 aktuell von der WHO als „High-Risk“ definierten Genotypen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 eingeschlossen. Unter Berücksichtigung der vom jeweiligen Test standardmäßig gemessenen Genotypen (QG-MPH HR-HPV-Diagnostik: 18 Genotypen, PCR: 14 Genotypen) wurden ebenso, wie beim Vergleich QG-MPH HR-HPV-Diagnostik vs. HC2, unabhängig von den eingeschlossenen Genotypen (QG-MPH HR-HPV-Diagnostik: 13 bzw. 18 Genotypen, HC2: 13 Genotypen), nahezu identische Ergebnisse erzielt. Die Analysen der einzelnen HR-HPV-Genotypen ergaben in der Entwicklungsstudie Konkordanzen von 78,7 %–99,9 % mit κ -Werten von 0,08–0,82. Im Vergleich dazu zeigt die MABE-Studie größtenteils höhere Konkordanzen (93,7 %–100 %) und niedrigere κ -Werte (0,00–0,67), was, wie in 5.1 bereits ausführlich erläutert, wahrscheinlich auf eine hohe Anzahl HR-HPV-negativer und gleichzeitig geringe Anzahl HR-HPV-positiver Proben zurückzuführen ist. Die aus diesem Grund eingeschränkt aussagekräftigen Ergebnisse der MABE-Studie sind somit nur bedingt mit den Resultaten der Entwicklungsstudie vergleichbar.

Zieht man statt der Übereinstimmungsanalysen die Sens.- und Spez.-Analysen zum Vergleich heran, so zeigt die QG-MPH HR-HPV-Diagnostik in der Entwicklungsstudie unter Verwendung der 14 oben genannten HR-HPV-Genotypen für die Endpunkte CIN2+ und CIN3+ eine Sens. von 84,1 % bzw. 86,6 % bei einer Spez. von 52,8 % bzw. 40,4 %. Im Vergleich dazu wurden in der MABE-Studie für die Endpunkte CIN2+ und CIN3+ mit 56 % bzw. 67 % niedrigere rohe Sens. und mit 87 % bzw. 85 % aber deutlich höhere rohe Spez. verzeichnet. Die adjustierte Sens. zeigt in der MABE-Studie Werte von 23 % bzw. 21 % und die adjustierte Spez. Werte von 97 %.

Die RS wurden in der Entwicklungsstudie genau wie die HR-HPV-Cutoffs unter Berücksichtigung des bestmöglichen Verhältnisses aus Sens. und Spez. für die jeweilige Krankheitsschwelle berechnet. Für den RS CIN2+ bzw. CIN3+ lag dabei die Sens. bei 73,4 % bzw. 82,4 % und die Spez. bei 78,0 % bzw. 63,3 %. In dieser Arbeit erreichte die QG-MPH CIN2+- bzw. QG-MPH CIN3+-Diagnostik für die Rohwerte 91,3 % bzw. 100,7% der Sens. und 106,4% bzw. 129,5% der Spez. der Entwicklungsstudie. Nach Adjustierung wurden 36,8 % bzw. 32,8 % der Sens. und 109,0 % bzw. 134,3 % der Spez. der Entwicklungsstudie erzielt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass in der MABE-Studie im Gegensatz zur Entwicklungsstudie nicht die reinen RS-Ergebnisse, sondern die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik aus der Zusammenschau der RS-Ergebnisse sowie der Biomarker „führender HPV“ leicht abweichend verwendet wurden (s. Kapitel 3.2.4). Insgesamt sprechen die gegenüber der Entwicklungsstudie vergleichbaren und mit einer Ausnahme höheren rohen Sens. und Spez. dieser Arbeit dafür, dass die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik unter Verwendung der RS auch an einer Screeningpopulation angewendet werden kann. Da in der MABE-Studie keine Frauen mit histologisch diagnostiziertem Karzinom vertreten sind, kann keine Aussage bezüglich des RS CxCa (QG-MPH CxCa-Diagnostik) gemacht werden. Sowohl die QG-MPH Dysplasie- und QG-MPH HR-HPV-Diagnostiken als auch alle anderen Untersuchungen in der MABE-Studie verzeichnen sehr niedrige adjustierte Sens. Dies liegt möglicherweise an dem wenig repräsentativen Studienkollektiv. In einem deutlich geringeren Maß ist dies an den ebenfalls im Vergleich zur Entwicklungsstudie niedrigen rohen Sens. des PAP und des HPV-Tests HC2 zu sehen. Es ist dabei allerdings zu berücksichtigen, dass für die Entwicklungsstudie der PAP-Cutoff IIID2 sowie der BD Onclarity™ als HPV-Test herangezogen wurden, während in der MABE-Studie mit dem PAP-Cutoff IIw bzw. IIID gearbeitet wurde und die HR-HPV-Ergebnisse auf denen des HC2 beruhen. Weiterhin muss erwähnt werden, dass die Entwicklungsstudie die Expertenpathologie nur eines Pathologen verwendet hat, während die histologischen Daten der MABE-Studie von verschiedenen, nicht kontrollierten Pathologen stammen und daher eventuell weniger konsistent sind. Insgesamt deuten die generell sehr niedrigen Sens. in der MABE-Studie an, dass die Sens. des QG-MPH-Tests in Wahrheit deutlich besser sind als diese Ergebnisse vermuten lassen. Tabelle 30 stellt die erreichten Sens.- und Spez. dieser Arbeit im Vergleich zu denen der Entwicklungsstudie dar.

Tabelle 30: Vergleich der Sensitivitäten und Spezifitäten für den RS CIN2+, RS CIN3+ bzw. für die QG-MPH CIN2+- und QG-MPH CIN3+-Diagnostik, für den PAP und für einen etablierten HPV-Test zwischen der QG-MPH-Entwicklungs- und der MABE-Studie.¹¹⁸

	Sensitivität		Spezifität	
	Entwicklungsstudie	MABE-Studie	Entwicklungsstudie	MABE-Studie
QG-MPH/RS* CIN2+	73,4 %	67 % (adj. 27 %)	78,0 %	83 % (adj. 85 %)
QG-MPH/RS* CIN3+	82,4 %	83 % (adj. 27 %)	63,3 %	82 % (adj. 85 %)
PAP für Gruppe CIN2+**	64,4 %	33 % (adj. 14 %)	90,3 %	92 % (adj. 98 %)
PAP für Gruppe CIN3+**	73,3 %	33 % (adj. 11 %)	74,8 %	91 % (adj. 98 %)
HPV-Test für Gruppe CIN2+***	98,3 %	89 % (adj. 37 %)	57,4 %	40 % (adj. 87 %)
HPV-Test für Gruppe CIN3+***	98,5 %	83 % (adj. 27 %)	38,2 %	38 % (adj. 85 %)

adj. = Adjustiert, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CxCa = Cervical Cancer, HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, HPV = Humanes Papillomvirus, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology, RS = Risikoscore, MABE = MARZY Study Material Analysis for Biomarker Expression

* Entwicklungsstudie benutzt die reinen RS-Ergebnisse für jede Dysplasieschwelle, MABE-Studie benutzt die kumulativen QG-MPH Dysplasie-Diagnosen (QG-MPH CIN2+ entspricht RS CIN2+ und/oder RS CIN3+ und/oder RS CxCa, QG-MPH CIN3+ entsprechend)

** Entwicklungsstudie benutzt den Cutoff PAP IIID2, MABE-Studie benutzt den Cutoff PAP IIID

*** Entwicklungsstudie benutzt den BD OnclarityTM, MABE-Studie benutzt den HC2

5.2.2 Vergleich der Ergebnisse der Standard-Screeningmethoden in der MABE-Studie mit denen anderer internationaler Studien (inklusive MARZY-Studie)

Zur Einordnung der Resultate dieser Arbeit in den Kontext aktueller weltweiter Forschungsergebnisse dient nachfolgend der Vergleich mit internationalen Studien zur Detektion von CIN2+. Die Metaanalyse von Cuzick et al. für Europa und Nordamerika verzeichnet eine durchschnittliche Sens. und Spez. des HC2 von 96 % bzw. 91 % für CIN2+. Dabei ist zu beachten, dass manche Studien in dieser Metaanalyse anstelle des HC2 die Konsensus PCR mit GP5+/6+ Primern verwendet haben. Diese beiden HPV-Tests weisen jedoch, wie in der Literatur beschrieben, eine hohe Konkordanz auf und liefern daher vergleichbare Ergebnisse.⁶⁵ Neben dem weltweiten Review von Koliopoulos et al. zeigt auch die kanadische Studie von Mayrand et al. mit einer adjustierten Sens. und Spez. von 95 % bzw. 94 % ähnliche Ergebnisse für den HC2.^{73,132}

Betrachtet man die zytologischen Ergebnisse, zeigt die Metaanalyse von Cuzick et al. eine durchschnittliche Sens. von 53 % und eine durchschnittliche Spez. von 96 % für CIN2+.⁶⁵ Außer, dass Koliopoulos et al. eine höhere Sens. für die Zytologie zu verbuchen haben, zeigen diese wie auch Mayrand et al. im Wesentlichen vergleichbare Ergebnisse (s. Tabelle 31).^{73,132}

Im Vergleich dazu stellen sich die Sens. der MABE-Studie sowohl hinsichtlich HC2 als auch hinsichtlich Zytologie erneut als unterdurchschnittlich dar. Insbesondere die adjustierten Sens. fallen deutlich von denen der internationalen Studien ab und deuten erneut auf eine fehlende Repräsentanz des Studienkollektivs hin. Die Ergebnisse der zugrundeliegenden MARZY-Studie mit einem untersuchten Screeningkollektiv von 2.627 Frauen – 203 davon mit histologischem

Ergebnis – lassen vermuten, dass dies wahrscheinlich der Selektion der in dieser Arbeit analysierten MABE-Subpopulation geschuldet ist. In der MARZY-Studie erreicht der HC2 nämlich eine Sens. von 95 % für CIN2+, was im Rahmen der Ergebnisse anderer internationaler Studien liegt. Allerdings ist zu erkennen, dass neben der MABE-Studie auch die MARZY-Studie im Vergleich mit internationalen Studien mit 47 % eine unterdurchschnittliche Sens. für die Zytologie aufweist.¹²⁰ Diese unterdurchschnittlichen Sens. der Zytologie spiegeln sich auch in anderen deutschen Studien wider. So können die Studie von Petry et al. im Raum Hannover und Tübingen eine mittlere Sens. von 44 % und die von Schneider et al. in Thüringen sogar nur eine Sens. von 18 % (adjustiert 20 %) ausweisen.^{133,134} Diese stark variierenden und v. a. regional schwankenden Ergebnisse könnten in der Subjektivität der zytologischen Begutachtung begründet sein. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Sens. und Spez. der genannten Studien gegenüber denen der MABE-Studie gibt Tabelle 31.

Tabelle 31: Vergleich der Sensitivitäten und Spezifitäten für die Zytologie und den HC2 hinsichtlich CIN2+ in der MABE-Studie mit denen anderer internationaler Studien (inklusive MARZY-Studie).^{65,73,120,132}

Method	Studie	Sensitivität	Spezifität
HC2	MABE	89 % (adj. 37 %)	40 % (adj. 87 %)
	MARZY	adj. 95 %	adj. 95 %
	Cuzick et. al	96 %*	91 %*
	Koliopoulos et al.	93 %	89 %
	Mayrand et. al	95 % (adj. 95 %)	61 % (adj. 94 %)
Zytologie	MABE LBC (Cutoff: PAP IIw)	22 % (adj. 9 %)	88 % (adj. 98 %)
	MABE PAP (Cutoff: PAP IIw)	33 % (adj. 14 %)	80 % (adj. 96 %)
	MARZY LBC (Cutoff: ASC-US)	adj. 47 %	adj. 99 %
	MARZY PAP (Cutoff: ASC-US)	adj. 47 %	adj. 97 %
	Cuzick et. al (Cutoff: PAP IIw/ASC-US/Borderline)	53 %	96 %
	Koliopoulos et al. LBC/PAP (Cutoff: ASC-US)	LBC 76 % PAP 66 %	LBC 92 % PAP 96 %
	Mayrand et. al PAP (Cutoff: ASC-US, AGC)	57 % (adj. 55 %)	81 % (adj. 97 %)

adj. = Adjustiert, AGC = Atypical Glandular Cells, ASC-US = Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, HC2 = Digene Hybrid Capture® 2 High-Risk-HPV-DNA-Test, LBC = Liquid-Based Cytology, MABE = MARZY Study Material Analysis for Biomarker Expression

* Diese Metaanalyse beinhaltet Studien, die anstelle des HC2 die Konsensus PCR von GP5+/6+ Primern als HPV-Test benutzt haben.

Die Metaanalyse von Arbyn et al. zeigt die unterschiedlichen Sens. und Spez. und damit die Vor- und Nachteile der verschiedenen Screeningmethoden Zytologie, HPV-Test und Cotesting auf. Hierbei erzielte der alleinige HC2 eine um 23 - 43 % (je nach Erkrankungsstadium sowie Zytologie-Cutoff) höhere Sens. bei einer gleichzeitig niedrigerer Spez. als die alleinige Zytologie.⁶⁷ Diese Tendenzen spiegelt im Wesentlichen auch die MABE-Studie unter Berücksichtigung der rohen und der adjustierten Werte wider. So erreicht hier der HC2 eine zweieinhalb- bis knapp über viermal so hohe Sens. (je nach zytologischer Untersuchungsmethode und dem Erkrankungsstadium) bei geringerer Spez. als die beiden zytologischen Methoden.

Weiterhin zeigt der Vergleich Cotesting (HC2 + Zytologie) vs. Zytologie im Stadium CIN3+ bei Arbyn et al. für das Cotesting eine um 33 % höhere Sens. bei 8 % weniger Spez. Die Hinzunahme der Zytologie zum HC2 beim Cotesting dagegen bewirkt für diese Erkrankungsgruppe lediglich einen Sensitivitätsgewinn von 2 % gegenüber dem alleinigen HC2 bei Spezifitätsverlusten.⁶⁷ Erneut können im Wesentlichen auch diese Ergebnisse durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. So erreicht das Cotesting in der MABE-Studie eine zweieinhalbmal so hohe Sens. wie die Zytologie bei 30 - 40 % (adjustiert 90 %) ihrer Spez. sowie die gleiche Sens. wie der HC2 bei Spezifitätsverlusten von bis zu 12 Prozentpunkten gegenüber diesem. Stellt man dem nun die Resultate der QG-MPH CIN3+-Diagnostik mit gleicher Sens. bei mindestens vergleichbarer, teilweise sogar höherer Spez. im Vergleich zum Cotesting und dem HC2 gegenüber, so bietet der QG-MPH durchaus eine denkbare Screeningalternative, die die Nachteile beider – des HC2 und der Zytologie – ausgleicht.

Weiterhin haben Arbyn et al. mithilfe von FU-Ergebnissen die prognostische Aussagekraft der verschiedenen Tests ausgewertet. Dabei war eine signifikant kleinere kumulative Inzidenzrate einer CIN3+ unter den im BL HPV-negativen als unter den im BL Zytologie-negativen Frauen zu verzeichnen. Der Unterschied zwischen Frauen mit einer doppelten Negativität (Zytologie und HPV) und den HPV-negativen Frauen, unabhängig von der zytologischen Diagnose, fiel dabei sehr klein aus.⁶⁷ Dillner et al. können diese Ergebnisse mit einer in ihrer Arbeit errechneten kumulativen Inzidenzrate einer CIN3+ nach sechs Jahren von 0,27 % bei HPV-negativen vs. 0,97 % bei Zytologie-negativen Frauen bestätigen.¹³⁵ Da in dieser Arbeit bezüglich der Prognostik aufgrund zu geringer Fallzahlen mit gesicherter Histologie nur vage Aussagen gemacht werden konnten, ist ein direkter Vergleich mit den hier genannten Studien nicht sinnvoll.

5.3 Weiterführender wissenschaftlicher Kontext

Die Histologie, der aktuelle Goldstandard in der Diagnostik eines Zervixkarzinoms, basiert auf einer subjektiven Beurteilung der Probe durch einen Pathologen. Dieser klassifiziert das untersuchte Gewebe in die Diagnosen Normal, Dysplasiestadium CIN1, CIN2, CIN3 und Karzinom. Dabei wird lediglich die Morphologie der Zellen begutachtet, ohne molekularbiologische Aspekte zu beachten. Stoler et al. haben im Rahmen der ALTS-Studie (ASCUS/LSIL Triage Study for Cervical Cancer) die Reproduzierbarkeit der histologischen Beurteilung von zervikalen Biopsien untersucht. Der von ihnen durchgeführte Vergleich zwischen zwei unabhängigen histologischen Bewertungen derselben Biopsate zeigte eine nur moderate Interobserver-Reproduzierbarkeit ($\kappa = 0,46$).¹³⁶

Dysplasiestadium CIN2 bedeutet, dass bis zu zwei Drittel des Epithels unreife Basalzellen und Mitosen beinhalten, aber das obere Drittel nicht infiltriert ist.¹³⁷ Es stellt den Übergang zwischen einer häufig regredient verlaufenden CIN1 und einer möglicherweise sich zum Karzinom entwickelnden CIN3 dar.¹³⁸ Da eine CIN2 häufiger als eine CIN3 ausheilt,¹³⁸ ist die korrekte Diagnose dieses Stadiums von großer Bedeutung. Aus diesem Grund konzentrierten sich Castle et al. im Rahmen der ALTS-Studie auf dieses Erkrankungsstadium. Dabei stellte sich heraus, dass die Diagnose CIN2 nur zu 43,4 % durch den unabhängigen zweiten Pathologen bestätigt wurde. Bei einigen dieser Patientinnen wurde zusätzlich ein mittels LEEP (Loop Electrical Excision Procedure) entnommenes Biopsat bzw. entnommener Konus histologisch untersucht. Wurde dieses Präparat zur Vergleichsbeurteilung herangezogen, so zeigte sich auch für diesen Vergleich hinsichtlich der Diagnose CIN2 eine Übereinstimmung von lediglich 25 %.¹³⁹ Die Arbeiten verdeutlichen, dass die Histologie mit starken Unsicherheiten behaftet ist. Da diese jedoch als Goldstandard für die Etablierung neuer Tests herangezogen wird, ist es wichtig, deren Schwächen auch bei der Analyse der vorliegenden Arbeit zu bedenken, denn dies bedingt, dass die Vorteile der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik, die sich aus ihrer molekularbiologischen Betrachtungsweise ergeben, nicht zwangsläufig erkennbar sind. Das Ergebnis der QG-MPH Dysplasie-Bestimmung mag näher an der Wahrheit liegen als die potentiell fehlerhafte subjektive Beurteilung durch einen Pathologen.

Der Einsatz von Biomarkern in der Diagnostik von Karzinomen ist in den letzten Jahren immer stärker in den Fokus der Forschung gerückt. So wurde die immunzytochemische Färbung bereits in die Abklärungsdiagnostik des Zervixkarzinoms aufgenommen.²¹ Eine Studie von Ikenberg et al. zeigt, dass das p16-Ki-67-Dual-Stain-Verfahren bei der Detektion von CIN2+ eine im Vergleich zur konventionellen PAP-Untersuchung höhere Sens. (86,7 % vs. 68,5 %) bei vergleichbarer Spez. (~95 %) verbuchen kann.⁷¹ Weiterhin sind auch immunhistochemische Färbungen von Biopsien möglich. So zeigen die Biomarker TOPO2 α und MCM2 insbesondere für das Stadium HSIL starke Anfärbungen und ermöglichen eine spezifischere Diagnostik der Dysplasiestadien (s. BD ProEx™ C Reagent).¹⁴⁰ Dies gilt auch für die immunhistochemische Färbung von Stathmin, welches in CIN 3 und Karzinomen überexprimiert wird.⁸³

Neben der HR-HPV-Detektion mittels DNA existieren auch Methoden, die mRNA der Virussequenzen E6 und E7 messen. Dabei stellt APTIMA® (Hologic) den ersten im Screening zugelassenen und etablierten mRNA-basierten HPV-Test dar.²¹ Sowohl in der Studie von Wu et al. als auch in der von Ratnam et al. zeigt sich dieser sogar mit einer leicht höheren Sens. und v. a. aber einer höheren Spez. gegenüber dem HC2.^{141,142}

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion von Zervixkarzinomen und ihren Vorstufen bietet der Nachweis von methylierten DNA-Regionen, da mit der Entstehung von Krebszellen (Transformation) auch Veränderungen der DNA, u. a. bezüglich Methylierungen, assoziiert sind, die zu veränderter Genexpression, wie dem Abschalten von Tumorsuppressorgenen, führen.¹⁴³ Schmitz et al. haben in ihrer Arbeit einen Score, basierend auf einer Messung von sechs Methylierungsmarkern (ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17 und ZNF671), validiert. Dabei zeigen sie, dass alle Karzinome sowie 2/3 der High-Grade CIN-Läsionen mithilfe dieses Scores detektiert wurden. Darüber hinaus konnte für diesen Score eine höhere Spez. als für das p16-Ki67-Dual-Stain-Verfahren und den HPV-Test Cobas® verzeichnet werden. Ob es sich bei den nicht detektierten High-Grade Dysplasie-Diagnosen womöglich um Läsionen mit Regressionstendenz handelt, muss anhand von Langzeitstudien noch untersucht werden.¹⁴⁴

Für die quantitative Messung von mRNA bildet bislang die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) den Goldstandard. Das Review von Scerri et al. zeigt, dass der QG-MPH im Vergleich zur qRT-PCR eine robuste, kosteneffiziente Methode mit hohem Durchsatz darstellt. Im Gegensatz zur qRT-PCR muss beim QG-MPH nicht erst die RNA extrahiert, in DNA umgeschrieben und dann mittels PCR amplifiziert werden. Vielmehr kann das Zelllysate der Proben direkt an Capture-Sonden hybridisiert, durch Detector-Sonden identifiziert und nach der anschließenden Signalamplifikation mit ausreichend hoher Sensitivität gemessen werden. Diese Reduktion der Arbeitsschritte durch den QG-MPH, wodurch u. a. auch die Gefahr von Kontaminationen und Messfehlern sinkt, wird in Abbildung 25 dargestellt. Weiterhin bietet der QG-MPH, wie bereits erwähnt, die Möglichkeit des Multiplexings, wobei bis zu 80 Marker in einer Probe gleichzeitig gemessen werden können und damit im 96-Well-Format 92 Patientinnenproben und vier Kontrollen in einem Arbeitsgang bearbeitet werden können.¹¹⁵ Eine Übersicht der sogenannten Hands-on-Zeiten für den QG-MPH und für die qRT-PCR bei einer Messung von fünf bzw. 40 Markern gleichzeitig veranschaulicht Tabelle 32. Hierbei wird deutlich, dass v. a. das Multiplexing zu einer bedeutenden Zeit- und Kostenersparnis führt. Da eine längere Lagerung der Proben zur Degradation von RNA führt, zeigen Baldacchino et al. anhand von archiviertem, in Paraffin eingebettetem Brustkrebsgewebe, dass der QG-MPH auch mit sehr wenig vorhandenem Material gute Messergebnisse liefern kann. Dies gilt auch für kleine Proben wie z. B. Mikrodissektionen.¹⁴⁵ Außerdem zeigt das Review von Scerri et al., dass der QG-MPH bei bis zu 18 Jahre alten Paraffinpräparaten eine HER2- und ER-Positivität nachweisen kann, während dies mit der qRT-PCR nur bei höchstens 12 Jahre alten Proben möglich ist.¹¹⁵

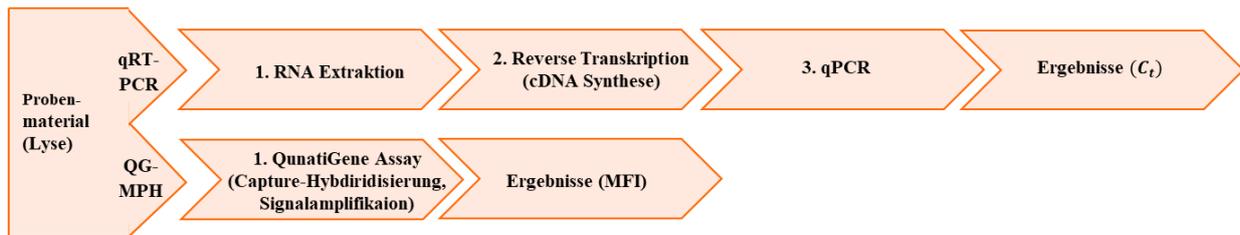


Abbildung 25: Vergleich der Arbeitsschritte der qRT-PCR mit denen des QG-MPH. (*cDNA* = *Complementary DNA*, *MFI* = *Mittlere Fluoreszenzintensität*, *QG-MPH* = *QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology*, *qPCR* = *Quantitative PCR*, *qRT-PCR* = *Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR*, *RNA* = *Ribonucleic Acid*) [Modifiziert nach Scerri et al., 2018¹¹⁵]

Tabelle 32: Vergleich der Hands-on-Zeit des QG-MPH mit der der qRT-PCR für die Messung von fünf bzw. 40 Biomarkern. [Modifiziert nach Scerri et al., 2018¹¹⁵]

Arbeitsschritte		5-plex		40-plex	
		qRT-PCR	QG-MPH	qRT-PCR	QG-MPH
Präanalytik	Zellyse & Homogenisierung	30 min	30 min	30 min	30 min
	RNA Extraktion	30 min	/	30 min	/
	cDNA Synthese	15 min	/	15 min	/
Analytik	QG-MPH Tag 1/qPCR	1 h	30 min	8 h	30 min
	QG-MPH Tag 2	/	1 h	/	1 h
Insgesamt		2 h 15 min	2 h	9 h 15 min	2 h

cDNA = *Complementary DNA*, *QG-MPH* = *QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology*, *qPCR* = *Quantitative PCR*, *qRT-PCR* = *Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR*, *RNA* = *Ribonucleic Acid*

Dass die Betrachtung von Kombinationen verschiedener Biomarker sinnvoll ist, zeigen del Pino et al. in ihrer Arbeit. Dabei erzielte die Kombination der mRNA-Messwerte von TOPO2 α und p16 für die Detektion von HSIL eine bessere Balance zwischen Sens. und Spez. als die Einzelergebnisse dieser Biomarker.¹⁴⁶ Auch die Arbeit von Bourmenskaya beschreibt eine neue Formel, welche u. a. die Verhältnisse der Biomarker p16 zu BAX und Progesteronrezeptor zu Ki67 beinhaltet.¹⁴⁷ Insgesamt zeigen diese Studien, dass der in dieser Arbeit zu validierende QG-MPH, basierend auf einer quantitativen mRNA-Messung verschiedener HR-HPV-Genotypen und zellulärer Biomarker sowie der anschließenden RS-Berechnungen zur Dysplasie-Diagnostik, im Einklang mit den neusten Forschungserkenntnissen steht.

5.4 QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology-Test als Screeningalternative mit inkludierter Triagierung

Für den Einsatz einer Methode zur Triagierung bedarf es einer sehr hohen Spez. bei einer den Screeningtests entsprechenden Sens. Neben dieser sogenannten Testgüte (Accuracy) sind für die Anerkennung als Screeningtest weitere drei Kriterien von besonderer Bedeutung: die prognostische Fähigkeit, der zeitliche Aufwand und die Kosten.

Die Testgüte der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik wurde in dieser Arbeit ausführlich in Kapitel 5.1 und 5.2 erläutert. Dabei wurde resümiert, dass diese im Vergleich zum neu eingeführten Cotesting eine vergleichbare, teils sogar höhere Spez. bei für den Endpunkt CIN3+ gleicher Sens. sowie bei für den Endpunkt CIN2+ nur teilweise niedrigerer Sens. erreicht. Weiterhin zeigt die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik bei einer überwiegend leicht niedrigeren Spez. eine deutlich höhere Sens. als die Zytologie sowie eine vergleichbare, teilweise höhere Spez. als die etablierten HPV-Tests bei gleicher Sens. für den histologischen Endpunkt CIN3+ und nur teilweise niedrigerer Sens. für den histologischen Endpunkt CIN2+. Insgesamt kann in dieser Arbeit für die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik, insbesondere für den Endpunkt CIN3+, eine in Relation zu den anderen Methoden hohe Testgüte vermerkt werden. Mithilfe der kombinierten QG-MPH HR-HPV-Diagnostik könnten darüber hinaus Angaben zum führenden HR-HPV-Genotyps gemacht werden. Aufgrund der relativ kleinen Studienpopulation, die für diese Arbeit zur Verfügung stand, sind diese Ergebnisse allerdings nur eingeschränkt aussagekräftig.

Bezüglich der prognostischen Fähigkeit der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik können an dieser Stelle keine konkreten Aussagen gemacht werden, da aufgrund der geringen Anzahl an Frauen mit histologischem Befund im BL und FU ausschließlich Einzelfälle betrachtet werden konnten.

Die Hands-on-Zeit des QG-MPH mit dem Vorteil des Multiplexings wurde bereits im vorherigen Kapitel detailliert mit der der qRT-PCR verglichen. Für die etablierten HPV-Tests kann aufgrund unterschiedlicher Durchführungen der Methoden keine generelle Hands-on-Zeit bestimmt werden. Unabhängig von der benötigten Zeit für die zytologische Beurteilung setzt sich das Cotesting im Gegensatz zur QG-MPH Dysplasie-Diagnostik mit kombinierter QG-MPH HR-HPV-Diagnostik immer aus zwei Untersuchungen zusammen und benötigt dementsprechend mehr Zeit. Ein weiterer Vorteil der kombinierten QG-MPH Diagnostik besteht darin, dass das Primärscreening und die Triagierung gleichzeitig anhand eines einzigen Abstrichs und Messvorgangs vorgenommen werden können, wodurch der Patientin die weiteren Abklärungsuntersuchungen erspart bleiben. Dies hätte nicht nur einen enormen Zeitgewinn für Patientin und Arzt zu Folge, sondern könnte auch die physische und psychische Belastung der Frauen, bedingt durch die Unannehmlichkeiten der Abklärungsuntersuchungen, reduzieren. Hierbei sind v. a. die Kolposkopie und die Entnahme der Gewebeproben zu erwähnen. Diese Einsparungen sind v. a. auch in Entwicklungsländern mit unzureichender Infrastruktur und dementsprechend eingeschränkter Erreichbarkeit des Arztes und Pathologen bzw. Zytologen von enormem Interesse.

Da in Deutschland seit Januar 2020 alle Frauen ab dem 35. Lebensjahr ein Cotesting mit Zytologie und HPV-Test und alle Frauen zwischen 20 und 34 Jahren weiterhin jährlich die bislang übliche

Zytologie als Screening erhalten,⁶⁶ werden in Tabelle 33 die Kosten dieser beiden Vorsorgealgorithmen denen des QG-MPH gegenübergestellt. Vergleicht man die Gesamtkosten des Primärscreenings, so kommt der QG-MPH zwar teurer als die Zytologie, aber in einigen Fällen preisgünstiger als das Cotesting. Doch den entscheidenden Vorteil des QG-MPH bildet erneut die Fähigkeit, als kombinierter Screening- und Triagierungstest fungieren zu können und so Kosten für weitere Abklärungsdiagnostiken einzusparen. Auch wenn nicht bei jeder Abklärung alle Untersuchungen durchgeführt werden müssen, sind mit bis zu 217,94 € vs. 64,27 € Gesamtkosten deutliche Unterschiede zwischen dem aktuellen Abklärungsvorgehen und dem mittels QG-MPH zu konstatieren.¹⁴⁸ Dies gilt für Deutschland, ist aber auch für Entwicklungsländer von großer Bedeutung. Neben der Kostenaufstellung zeigt Tabelle 33 auch die Faktoren Belastung und Zeitaufwand für die Patientin sowie Dauer bis zum endgültigen Befund der Abklärungsdiagnostik.

Tabelle 33: Übersicht der erwarteten Kosten, Belastung und Dauer des aktuellen Screenings und der Abklärungsdiagnostik im Vergleich mit denen des QG-MPH. [Modifiziert nach Gebärmutterhalskrebs-Früherkennung - Neues organisiertes Programm im Überblick, 2021¹⁴⁸]

		Aktuelles Screening (nach EBM)		Alternatives Screening mit QG- MPH
		20.-34. LJ	ab 35. LJ	
Primär- screening	Klinische Untersuchung einschließlich Abstrichentnahme	23,92 €	23,92 €	23,92 €
	Zytologische Untersuchung	9,01 €	9,01 €	/
	QG-MPH	/	/	30,00 €
	HPV-Test	/	17,02 €	/
	HPV-Genotypisierung bei positivem Ergebnis auf HPV-Typen 16 und 18	/	17,02 €	/
	Insgesamt	32,93 €	bis 66,97 €	53,92 €
Abklärungs- diagnostik	Abstrichentnahme, Befundmitteilung und diesbezügliche Beratung	10,35 €	10,35 €	10,35 €
	Abklärungskolposkopie	80,99 €	80,99 €	/
	Zytologische Untersuchung einschließlich weiterführender immunohistochemischer Färbeverfahren	32,04 €	32,04 €	/
	HPV-Test	17,02 €	/	/
	Histologische Untersuchung bei der Abklärungskolposkopie	27,59 €	27,59 €	/
	HPV-Genotypisierung bei positivem Ergebnis auf HPV-Typen 16 und 18	17,02 €	/	/
	Insgesamt	bis 185,01 €	bis 150,97 €	10,35 €
Kosten insgesamt (Primärscreening mit Abklärung)	bis 217,94 €	bis 217,94 €	64,27 €	
Diagnose	Negativ, Dysplasie (CIN1–3), Karzinom			
Belastung und Zeitaufwand für die Patientin	Mehrere Tests (ggf. Biopsie), mehrere Arztbesuche		Ein Test ohne Biopsie, ein Arztbesuch	
Dauer bis zum endgültigen Befund der Abklärungsdiagnostik	Bis zu 3 Monate nach Algorithmus		ca. 4 Tage	

CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, EBM = Einheitlicher Bewertungsmaßstab, HPV = Humanes Papillomvirus, LJ = Lebensjahr, QG-MPH = QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology

Durch den QG-MPH können also gegenüber dem Cotesting der über 34-jährigen und auch gegenüber der Abklärungsdiagnostik generell Zeit und Kosten eingespart werden. Zur Verbesserung der Testgüte bedarf jedoch insbesondere die QG-MPH CIN2+-Diagnostik hinsichtlich der Sens. weiterer Optimierungen. Außerdem muss die prognostische Fähigkeit des QG-MPH mit aussagekräftigeren Studien untermauert werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit allerdings bereits an, dass der QG-MPH durchaus eine Screening- und Triagierungsalternative darstellt und es sich lohnt, weitere Optimierungen und Validierungen durchzuführen.

5.5 Limitationen der Arbeit

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind einigen Einschränkungen hinsichtlich der Studienpopulation, der Probenqualität sowie der Mess- und Auswertungsmethodik unterworfen. Im Folgenden werden die wesentlichen aufgeführt und erläutert.

Für diese Arbeit wurde lediglich eine Subpopulation einer Screeningstudie, bestehend aus allen in der Zytologie (LBC-Zweitmeinung \geq ASC-US), im HR-HPV-Test (HC2 und/oder GP5+/6+ PCR Enzymimmunoassay (14 HR-HPV-Genotypen)) und/oder in der Histologie (\geq CIN1) des BL und/oder des FU auffälligen Frauen und einer gleich großen Kontrollgruppe, herangezogen. Dadurch fallen die HPV-Prävalenz sowie der Anteil an Frauen mit pathologischem Histologie-Ergebnis in dieser Arbeit höher aus, als es bei einer vollständigen Screeningpopulation die Regel ist. Da in der MARZY-Studie neben den Screening-positiven Teilnehmerinnen lediglich 5 % der Screening-negativen Frauen zur weiterführenden Kolposkopie eingeladen wurden und davon wiederum nicht alle gekommen sind bzw. nicht alle eine histologische Untersuchung erhalten haben, konnte einerseits für die Querschnittsanalysen zur Sens.- und Spez.-Bestimmung nur ein kleines Kollektiv berücksichtigt werden. Andererseits bedingt dies eine Abhängigkeit zwischen Screeningergebnis und Abklärungshistologie, was zu falsch hohen Sens. und falsch niedrigen Spez. führen kann. Um diesen Verifikationsbias herauszufiltern, wurde in dieser Arbeit für die Sens., Spez. sowie LR^+ und LR^- neben der rohen auch eine adjustierte Variante bestimmt. Für die dabei entstandenen sehr niedrigen adjustierten Sens. ist vermutlich eine fehlende Repräsentanz des Studienkollektivs durch die Probenselektion aus der ursprünglichen, vollständigen MARZY-Studie ursächlich. Weiterhin liegt in dieser Studienpopulation keine Teilnehmerin mit einem histologisch diagnostizierten Karzinom vor, sodass die QG-MPH CxCa-Diagnostik nicht beurteilt werden kann. Damit der QG-MPH als Screeningtest eingesetzt werden kann, ist somit eine weitere Validierung an einer deutlich größeren, vollständigen Screeningpopulation notwendig.

Für die uneingeschränkte prognostische Bewertung des QG-MPH stehen in dieser Arbeit nur zwei Frauen mit einem histologischen Befund im BL und im FU zur Verfügung, sodass diesbezüglich lediglich Andeutungen mittels deskriptiver Auswertungen, größtenteils unabhängig von den histologischen Ergebnissen, sowie Fallbeschreibungen ohne weitere statistische Analysen gemacht werden können. Weiterhin erhöht der Abstand von mehreren Jahren zwischen dem BL und dem FU die Wahrscheinlichkeit von Neuerkrankungen und Ausheilungen. Die Tatsache, dass in diesen Fällen der Verlauf aus dem BL heraus zwangsläufig noch nicht prognostiziert werden kann, schränkt die Aussagekraft dieser prognostischen Analyse weiter ein. Hinzu kommt, dass die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik basierend auf den Querschnittsergebnissen der Histologie entwickelt wurde, dieser jedoch kein prognostisches Potential nachgesagt wird. Da auch die prognostische Aussagekraft einer Methode für die Etablierung im Screening notwendig ist, wäre somit die Bildung eines weiteren Scores hinsichtlich Prognostik sinnvoll. Dieser müsste anschließend anhand einer großen, longitudinalen Screeningstudie validiert werden, wobei eine Betrachtung mehrerer histologischer FU-Untersuchungen der Patientinnen mit kurzen Zeitabständen die Aussagekraft erhöhen würde.

Weiterhin ist zu bedenken, dass die in dieser Arbeit verwendeten Abstriche im Zeitraum von 2005 bis 2012 abgenommen und seitdem bei -20 °C gelagert wurden. Eine solche über längere Zeit andauernde Lagerung kann eine Abnahme der Probenqualität zur Folge haben. Für die Querschnittsanalysen mussten insgesamt 22 BL-Proben aufgrund zu niedriger Actin- β -Werte ausgeschlossen werden, wodurch sich die Anzahl an auswertbaren Proben weiter reduziert hat. Ob dies durch die Lagerung oder durch eine schlechte Abnahme des Abstrichs durch den Gynäkologen verursacht wurde, kann nicht abschließend beurteilt werden, jedoch veranschaulicht dies die Notwendigkeit einer prospektiven Screeningstudie zur Verbesserung der Ergebnisqualität.

Bezüglich der QG-MPH-Messungen ist zu beachten, dass in dieser Arbeit ein anderer Beadmix als für die Entwicklung der RS verwendet wurde. Die Validierung dieser beiden Beadmixe zeigt zwar keine gravierenden Abweichungen, aber auch keine absolute Übereinstimmung, sodass in Zukunft genaue Anpassungen der RS-Berechnungen und der HR-HPV-Cutoffs an jedem neuen Beadmix durchgeführt werden sollten. Weiterhin bedarf es einer Standardisierung zur Validierung der unterschiedlichen Beadmix-Chargen, um so die Reproduzierbarkeit weiter zu verbessern. Es ist weiterhin zu erwähnen, dass sich die Verwendung des Biomarkers „führender HPV“ zwischen dieser Arbeit und der Entwicklungsstudie geringfügig unterscheidet. Die Tatsache, dass zwei der fünf Biomarker, die in die RS CIN2+ und RS CIN3+ eingehen, HPV 16-Splicemarker sind, könnte außerdem zu einer Unterrepräsentation von Nicht-HPV 16-Infektionen als Ursache von

Zervixdysplasien führen. Um dem entgegenzuwirken, könnte die Entwicklung weiterer Scores für andere HR-HPV-Genotypen sinnvoll sein.

Auch in dieser Arbeit gelten dieselben Einschränkungen bezüglich der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik, wie sie in der Entwicklungsstudie von M. Basten aufgeführt werden. Bei einem Abstrich erhält man gesunde und dysplastische Zellen, sodass sich je nach Größe der Dysplasie oder Abstrichtechnik deren Verhältnis ändern kann. Da Actin- β , ein Haushaltsgen, im Gegensatz zu den anderen Biomarkern sowohl in gesunden als auch in dysplastisch veränderten Zellen exprimiert wird, kann die Normierung auf Actin- β bei hohem Anteil gesunder Zellen fälschlich zu niedrigen relativierten Werten der Biomarker führen. Eine von Basten vorgeschlagene Alternative wäre eine Normierung auf einen Dysplasiemarker, wie z. B. p16.¹¹⁸ Da dieser Biomarker allerdings im Verdacht steht, nicht nur bei Dysplasien, sondern auch bei anderen Erkrankungen wie z. B. einer Zervizitis, erhöht vorzuliegen, stellt auch dies keine ideale Lösung dar.

Die Tatsache, dass alleine eine über dem Cutoff liegende Erhöhung von p16 für die RS CIN3+-Positivität ausreicht, könnte u. a. aufgrund des oben genannten Verdachts des Zusammenhangs dieses Biomarkers mit anderen Erkrankungen zu falsch positiven Ergebnissen führen. Um dies zu verhindern, wäre womöglich die Bedingung, dass für ein positives RS-Ergebnis mindestens zwei Biomarker über ihrem jeweiligen Cutoff liegen müssen, angebracht. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit wäre, eine Probe nur dann in ein bestimmtes QG-MPH Dysplasiestadium einzustufen, wenn auch alle jeweils niedrigeren RS positive Ergebnisse zeigen. So soll beispielsweise nur dann die Diagnose QG-MPH CIN3+ gestellt werden, wenn neben dem RS CIN3+ auch der RS CIN2+ positiv ist.

Abschließend sei noch das ausführlich diskutierte Dilemma bezüglich des Goldstandards zu erwähnen, denn die Subjektivität und schwache Reproduzierbarkeit der Histologie (s. Kapitel 5.3) schränken die Validierungen neuer Verfahren generell stark ein. Außerdem werden durch ihre rein morphologische Betrachtungsweise womöglich Vorteile molekularbiologischer Verfahren sowie deren prognostisches Potential übersehen.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Seit Januar 2020 wird bei allen Frauen ab dem 35. Lebensjahr die jährliche zytologische Untersuchung um einen HPV-Test erweitert und ein sogenanntes Cotesting durchgeführt. Dafür findet die Untersuchung nur noch alle drei Jahre statt. Dies soll zur Erhöhung der bislang niedrigen Sens. des Screenings führen. Da hierbei auch transiente HPV-Infektionen ohne Dysplasie detektiert werden, bedingt dies einen Abfall der Spez., was wiederum gute Triagierungstests notwendig macht.

Der QG-MPH hat dagegen das Potential, Screening und Triagierung in nur einer Untersuchung abzudecken. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik für den histologischen Endpunkt CIN3+ eine weitestgehend höhere Spez. als die vier Cotesting-Varianten erreicht und dabei die gleiche Sens. aufweist. Da im Stadium CIN3 aufgrund der deutlich erhöhten Gefahr einer Karzinomentwicklung eine Konisation als Therapie empfohlen wird, ist insbesondere in diesem Stadium eine hohe diagnostische Testgüte von großer Bedeutung. In dieser Hinsicht können die Ergebnisse der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik überzeugen, obwohl diese in der Gruppe CIN2+ eine etwas niedrigerer Sens. bei dennoch größtenteils höherer Spez. im Vergleich zu den Cotesting-Varianten aufweist. Durch das zusätzliche Potential des QG-MPH bei der Triagierung können den Frauen außerdem weitere Abklärungsuntersuchungen erspart werden, wodurch wiederum Zeit, Kosten und Stress reduziert würden. Dies würde bei Ärzten und Patientinnen die Akzeptanz erhöhen. Weiterhin deuten die Ergebnisse dieser Arbeit an, dass die QG-MPH Dysplasie-Diagnostik über eine potente prognostische Aussagekraft verfügt, die jedoch in größeren longitudinalen Studien weiter untersucht werden muss.

Die Bildung zusätzlicher RS für Nicht-HPV 16-Infektionen kann zu einer weiteren Erhöhung der Aussagekraft führen. Darüber hinaus sollte zur Verbesserung der Ergebnisreproduzierbarkeit die Beadmix- und Chargenvalidierung optimiert und standardisiert werden. Möglicherweise ist auch die Umstellung der Normierung auf einen Dysplasie-spezifischen Biomarker zur Erhöhung der diagnostischen Testgüte der QG-MPH Dysplasie-Diagnostik erforderlich, wobei diese eventuell auch durch die Weiterentwicklung der bestehenden RS-Formeln unter Einbeziehung der genauen Expressionsstärke der Biomarker anstelle einer Dichotomisierung durch Cutoffs erreicht werden kann.

Um die positiven Tendenzen dieser Arbeit in Bezug auf den QG-MPH zu untermauern, ist jedoch zunächst die genaue Untersuchung der Prognostik dieser Methode sowie eine weitere Validierung für das Screening an einer großen prospektiven, longitudinalen Screeningstudie notwendig.

Literaturverzeichnis

1. Ruge C, Veit J. Der Krebs der Gebärmutter. Dtsch. Med. Wochenschr. 1882;7:378-379.
2. Hinselmann H. Einführung in die Kolposkopie. Hamburg: Hamburg: Hartung; 1933.
3. Classes in oncology: George Nicholas Papanicolaou's new cancer diagnosis presented at the Third Race Betterment Conference, Battle Creek, Michigan, January 2-6, 1928, and published in the Proceedings of the Conference. CA Cancer J. Clin. May-Jun 1973;23(3):174-179.
4. David M, Ebert A. Methoden und ihre Namensgeber. George N. Papanicolaou (1883–1962) und die zytologische Portio-Diagnostik. Geburtshilfe Frauenheilkd. 2013;73(2):114-116.
5. Petry KU, Wörmann B, Schneider A. Benefits and risks of cervical cancer screening. Oncology research and treatment. 2014;37 (3):48-57.
6. zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancer. Appl. Pathol. 1987;5(1):19-24.
7. The Nobel Prize. 2008; <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2008/summary/>. Accessed 04.01.2019.
8. Li Y, Xu C. Human Papillomavirus-Related Cancers. Adv. Exp. Med. Biol. 2017;1018:23-34.
9. Arbyn M, de Sanjose S, Saraiya M, Sideri M, Palefsky J, Lacey C, Gillison M, Bruni L, Ronco G, Wentzensen N, Brotherton J, Qiao YL, Denny L, Bornstein J, Abramowitz L, Giuliano A, Tommasino M, Monsonogo J. EUROGIN 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease. Int. J. Cancer. 2012;131(9):1969-1982.
10. Cancer today (WHO). International Agency for Research on Cancer. 2021; <http://globocan.iarc.fr>. Accessed 18.03.2021.
11. Cancer Mortality Database (WHO). International Agency for Research on Cancer. 2019; <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>. Accessed 18.03.2021.
12. Krebs in Deutschland 2013/2014 - Gebärmutterhals. Robert-Koch-Institut. 2017; <https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/3270/22EwGndhBfkPkE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Accessed 24.09.2019.
13. Bergauer F, Maaßen V, Pietschmann D. Atypische Veränderungen und maligne Tumoren der Cervix uteri - Anamnese und Klinik. In: Weyerstahl T, Stauber M, eds. Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. 4. vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2013:226-232.
14. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Rev. Med. Virol. Mar 2015;25 Suppl 1:2-23.
15. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. Front. Biosci. Sep 1 2006;11:2286-2302.
16. IARC. Human Papillomaviruses. In: IARC, ed. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. Vol 100 B. 2012/11/30 ed2012:255-296.
17. Viariso D, Gissmann L, Tommasino M. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. Curr. Opin. Virol. Oct 2017;26:56-62.
18. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. Jun 20 2004;324(1):17-27.
19. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. Virology. Oct 2013;445(1-2):224-231.

Literaturverzeichnis

20. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. May 25 2010;401(1):70-79.
21. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms, Langversion 1.1. AWMF Registernummer: 015/027OL 2020; https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Zervixkarzinom_Praevention/LL_Pr%C3%A4vention_des_Zervixkarzinoms_Langversion_1.1.pdf. Accessed 06.04.2021.
22. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, de Sanjose S, Garnett G, Edmunds WJ, Claeys P, Goldenthal KL, Harper DM, Markowitz L. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull. World Health Organ*. Sep 2007;85(9):719-726.
23. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. Nov 20 2012;30 Suppl 5:F55-70.
24. Gross GE, Werner RN, Becker JC, Brockmeyer NH, Esser S, Hampl M, Hommel S, Jongen J, Mestel DS, Meyer T, Petry KU, Plettenberg A, Püschel K, Schneede P, Schöfer H, Sotlar K, Weyandt G, Wieland U, Wiese-Posselt M, Nast A. S2k Leitlinien HPV assoziierte anogenitale Läsionen 2017; Langversion. AWMF-Registernummer: 082-008 2017; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/082-0081_S2k_HPV_assoziierte_anogenitale_L%C3%A4sionen_2017-11.pdf. Accessed 08.01.2019.
25. Rylander E, Ruusuvaara L, Almstromer MW, Evander M, Wadell G. The absence of vaginal human papillomavirus 16 DNA in women who have not experienced sexual intercourse. *Obstet. Gynecol*. May 1994;83(5 Pt 1):735-737.
26. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am. J. Epidemiol*. Feb 1 2003;157(3):218-226.
27. Erickson AC, Couchman JR. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J. Histochem. Cytochem*. Oct 2000;48(10):1291-1306.
28. Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J. Virol*. Mar 2009;83(5):2067-2074.
29. Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. Dec 1 2009;106(48):20458-20463.
30. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. Mar 1 2003;307(1):1-11.
31. Smith JL, Campos SK, Ozbun MA. Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *J. Virol*. Sep 2007;81(18):9922-9931.
32. Doeberitz M, Vinokurova S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch. Med. Res*. Aug 2009;40(6):435-442.
33. Smith JL, Campos SK, Wandinger-Ness A, Ozbun MA. Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *J. Virol*. Oct 2008;82(19):9505-9512.
34. Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis. Markers*. 2007;23(4):297-313.

Literaturverzeichnis

35. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Jun 2004;68(2):362-372.
36. Chow LT, Duffy AA, Wang HK, Broker TR. A highly efficient system to produce infectious human papillomavirus: Elucidation of natural virus-host interactions. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. May 1 2009;8(9):1319-1323.
37. Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology*. Feb 20 2009;384(2):375-379.
38. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.* Oct 2003;77(19):10186-10201.
39. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. Sep 8 2007;370(9590):890-907.
40. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* Sep 1999;189(1):12-19.
41. Eurocytology. Zervixzytologie (Auf dem Laufenden, 2016) - 2. Anatomie, Histologie und Funktion der Zervix uteri (Gebärmutterhals). 2016; <https://www.eurocytology.eu/de/course/929>. Accessed 26.03.2021.
42. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Munger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Jun 26 2012;109(26):10516-10521.
43. Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* Nov 1987;6(11):3391-3397.
44. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci. (Lond.)*. May 2006;110(5):525-541.
45. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J. Virol.* Feb 1990;64(2):723-730.
46. Jones DL, Alani RM, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* Aug 15 1997;11(16):2101-2111.
47. Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonnayom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Aug 29 2000;97(18):10002-10007.
48. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin. Cancer Res.* May 1 2004;10(9):3059-3063.
49. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. Nov 26 2001;20(54):7874-7887.
50. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. Dec 21 1990;63(6):1129-1136.

Literaturverzeichnis

51. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J. Virol.* May 2001;75(9):4467-4472.
52. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature.* Mar 7 1996;380(6569):79-82.
53. McMurray HR, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J. Virol.* Sep 2003;77(18):9852-9861.
54. Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A, Banks L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology.* Aug 15 1994;203(1):73-80.
55. Epidemiologisches Bulletin Nr. 30, Robert-Koch-Institut. 2007;
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2007/Ausgabenlinks/30_07.pdf?__blob=publicationnFile. Accessed 01.04.2021.
56. Epidemiologisches Bulletin Nr.34. Robert-Koch-Institut. 2018;
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/34_18.pdf?__blob=publicationFile. Accessed 25.05.2020.
57. Drolet M, Benard E, Boily MC, Ali H, Baandrup L, Bauer H, Beddows S, Brisson J, Brotherton JM, Cummings T, Donovan B, Fairley CK, Flagg EW, Johnson AM, Kahn JA, Kavanagh K, Kjaer SK, Kliewer EV, Lemieux-Mellouki P, Markowitz L, Mboup A, Mesher D, Niccolai L, Oliphant J, Pollock KG, Soldan K, Sonnenberg P, Tabrizi SN, Tanton C, Brisson M. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* May 2015;15(5):565-580.
58. Chow EPF, Machalek DA, Tabrizi SN, Danielewski JA, Fehler G, Bradshaw CS, Garland SM, Chen MY, Fairley CK. Quadrivalent vaccine-targeted human papillomavirus genotypes in heterosexual men after the Australian female human papillomavirus vaccination programme: a retrospective observational study. *Lancet Infect. Dis.* Jan 2017;17(1):68-77.
59. Day PM, Kines RC, Thompson CD, Jagu S, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. In vivo mechanisms of vaccine-induced protection against HPV infection. *Cell Host Microbe.* Sep 16 2010;8(3):260-270.
60. Epidemiologisches Bulletin Nr.26. Robert-Koch-Institut. 2018;
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/26_18.pdf?__blob=publicationFile. Accessed 25.05.2020.
61. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N. Engl. J. Med.* May 10 2007;356(19):1928-1943.
62. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* Apr 15 2006;367(9518):1247-1255.
63. Epidemiologisches Bulletin Nr.01. Robert-Koch-Institut. 2018;
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/01_18.pdf?__blob=publicationFile. Accessed 25.05.2020.
64. Seifert U, Klug SJ. Early detection of cervical cancer in Germany: evidence and implementation. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* Mar 2014;57(3):294-301.

Literaturverzeichnis

65. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int. J. Cancer*. Sep 1 2006;119(5):1095-1101.
66. Beschluss über eine Änderung der Beauftragung des Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen: zur Erstellung von Einladungsschreiben und Versicherteninformation zum Zervixkarzinomscreening. Gemeinsamer Bundesausschuss. 2016; https://www.g-ba.de/downloads/39-261-2713/2016-09-15_Aenderung_Beauftragung-IQWiG_Einladung_Zervixkarzinom-Screening_vom-2015-03-19.pdf. Accessed 25.05.2020.
67. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, Koliopoulos G, Naucler P, Sankaranarayanan R, Peto J. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*. Nov 20 2012;30 Suppl 5:F88-99.
68. Beschlussbegründung über Änderung der Richtlinien über die Früherkennung von Krebserkrankungen („Krebsfrüherkennungs-Richtlinien“). Gemeinsamer Bundesausschuss. 2005; https://www.g-ba.de/downloads/40-268-48/2005-07-19-Abstrich_Begruendung.pdf. Accessed 25.05.2020.
69. Münchner Nomenklatur III für die gynaekologie Zytodiagnostik der Zervix ab 1.Juli 2014. Koordinierungs-Konferenz-Zytologie. 2013; <http://www.zytologie.org/media/data/Broschuere-Muenchner-Nomenklatur-III-fuer-die-gynaeko.pdf>. Accessed 24.09.2019.
70. Bethesda-System vs. Münchner Nomenklatur III und II Synlab. 2017; https://www.synlab.ch/docs/default-source/pr%C3%A4analytik/bethesda.pdf?sfvrsn=8cd7e6e4_8. Accessed 07.04.2021.
71. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J. Natl. Cancer Inst.* Oct 16 2013;105(20):1550-1557.
72. Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. Feb 8 2014;383(9916):524-532.
73. Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, Bryant A, Martin-Hirsch PP, Mustafa RA, Schunemann H, Paraskevidis E, Arbyn M. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database Syst. Rev.* Aug 10 2017;8:CD008587.
74. Ahr A, Scharl A. Zervixkarzinomfrüherkennung – Zytologie und Kolposkopie. In: Kaufmann M, Costa SD, Scharl A, eds. *Die Gynäkologie*. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed: Springer Verlag; 2013:356-363.
75. Chrysostomou AC, Stylianou DC, Constantinidou A, Kostrikis LG. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: The Transition Towards HPV Vaccination and Population-Based HPV Testing. *Viruses*. Dec 19 2018;10(12).
76. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int. J. Cancer*. Feb 1 2009;124(3):516-520.
77. Stoler MH, Castle PE, Solomon D, Schiffman M, American Society for C, Cervical P. The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP-guided management requires the use of well-validated assays. *Am. J. Clin. Pathol.* Mar 2007;127(3):335-337.
78. Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan BJ, Poljak M. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin. Microbiol. Infect.* Sep 2015;21(9):817-826.

Literaturverzeichnis

79. Bornstein J, Bentley J, Bosze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, Perrotta M, Prendiville W, Russell P, Sideri M, Strander B, Tatti S, Torne A, Walker P. 2011 colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet. Gynecol.* Jul 2012;120(1):166-172.
80. Luyten A, Buttman-Schweiger N, Hagemann I, Scherbring S, Boehmer G, Gieseck F, Woelber L, Glasenapp F, Hampl M, Kuehler-Obbarius C, van den Bergh M, Petry KU. Utility and Reproducibility of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy Classification of Transformation Zones in Daily Practice: A Multicenter Study of the German Colposcopy Network. *J. Low. Genit. Tract Dis.* Jul 2015;19(3):185-188.
81. Jenkins D. Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Dis. Markers.* 2007;23(4):199-212.
82. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J. Low. Genit. Tract Dis.* Jul 2012;16(3):205-242.
83. Howitt BE, Nucci MR, Drapkin R, Crum CP, Hirsch MS. Stathmin-1 expression as a complement to p16 helps identify high-grade cervical intraepithelial neoplasia with increased specificity. *Am. J. Surg. Pathol.* Jan 2013;37(1):89-97.
84. Wentzensen N. [Epidemiology, prevention and early detection of cervical cancer]. *Der Onkologe : Organ der Deutschen Krebsgesellschaft e.V.* Oct 2016;22(10):725-736.
85. Munro A, Powell RG, P AC, Bowen S, Spilsbury K, O'Leary P, Semmens JB, Codde J, Williams V, Steel N, Leung Y. Spontaneous regression of CIN2 in women aged 18-24 years: a retrospective study of a state-wide population in Western Australia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* Mar 2016;95(3):291-298.
86. Wang L. Value of serial cervical length measurement in prediction of spontaneous preterm birth in post-conization pregnancy without short mid-trimester cervix. *Sci. Rep.* Oct 17 2018;8(1):15305.
87. Kyrgiou M, Athanasiou A, Paraskevaidi M, Mitra A, Kalliala I, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Bennett P, Paraskevaidis E. Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* Jul 28 2016;354:i3633.
88. Baron C, Henry M, Tamalet C, Villeret J, Richet H, Carcopino X. Relationship between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA detection and quantitation and E6/E7 mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions. *J. Med. Virol.* Aug 2015;87(8):1389-1396.
89. Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, Clavel C, Gissmann L, Pawlita M. Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns. *Cancer Res.* Jan 1 2010;70(1):249-256.
90. Alloul N, Sherman L. Transcription-modulatory activities of differentially spliced cDNAs encoding the E2 protein of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* Sep 1999;80 (Pt 9):2461-2470.
91. Tang S, Tao M, McCoy JP, Jr., Zheng ZM. The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *J. Virol.* May 2006;80(9):4249-4263.
92. Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Cladel NM, Wu X, Doorbar J. The Viral E4 Protein Is Required for the Completion of the Cottontail Rabbit Papillomavirus Productive Cycle In Vivo. *J. Virol.* 2004;78(4):2142-2151.
93. Hofler D, Bohmer G, von Wasielewski R, Neumann H, Halec G, Holzinger D, Dondog B, Gissmann L, Pawlita M, Schmitt M. HPV16 RNA patterns defined by novel high-throughput RT-qPCR as triage marker in HPV-based cervical cancer precursor screening. *Gynecol. Oncol.* Sep 2015;138(3):676-682.

Literaturverzeichnis

94. Andersen MH, Svane IM, Becker JC, Straten PT. The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clin. Cancer Res.* Oct 15 2007;13(20):5991-5994.
95. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.* Aug 15 2008;14(16):5000-5005.
96. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett.* Dec 8 2006;244(2):164-171.
97. Branca M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Ciotti M, Costa S, Benedetto A, Casolati EA, Favalli C, Paba P, Di Bonito P, Mariani L, Syrjanen S, Bonifacio D, Accardi L, Zanconati F, Syrjanen K, Group HP-PIS. Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* Jul 2005;124(1):113-121.
98. Liu HQ, Wang YH, Wang LL, Hao M. P16INK4A and survivin: Diagnostic and prognostic markers in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* Aug 2015;99(1):44-49.
99. Athanasoula K, Gogas H, Polonifi K, Vaiopoulos AG, Polyzos A, Mantzourani M. Survivin beyond physiology: orchestration of multistep carcinogenesis and therapeutic potentials. *Cancer Lett.* Jun 1 2014;347(2):175-182.
100. Zejnullahu VA, Zejnullahu VA, Josifovska S, Vukovic N, Pakovski K, Panov S. Correlation of hTERT Expression with Cervical Cytological Abnormalities and Human Papillomavirus Infection. *Prilozi (Makedonska akademija na naukite i umetnostite. Oddelenie za medicinski nauki).* Dec 1 2017;38(3):143-151.
101. Tulake W, Yuemaier R, Sheng L, Ru M, Lidifu D, Abudula A. Upregulation of stem cell markers ALDH1A1 and OCT4 as potential biomarkers for the early detection of cervical carcinoma. *Oncol. Lett.* Nov 2018;16(5):5525-5534.
102. Escobar-Hoyos LF, Yang J, Zhu J, Cavallo JA, Zhai H, Burke S, Koller A, Chen EI, Shroyer KR. Keratin 17 in premalignant and malignant squamous lesions of the cervix: proteomic discovery and immunohistochemical validation as a diagnostic and prognostic biomarker. *Mod. Pathol.* Apr 2014;27(4):621-630.
103. Eldakhakhny S, Zhou Q, Crosbie EJ, Sayan BS. Human papillomavirus E7 induces p63 expression to modulate DNA damage response. *Cell Death Dis.* Jan 26 2018;9(2):127.
104. Das L, Naskar S, Sarkar T, Maiti AK, Das S, Chatterjee J. Immunohistochemical evaluation of prime molecules in cervical lesions towards assessment of malignant potentiality. *J. Cancer Res. Ther.* Jan-Mar 2018;14(2):377-381.
105. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* Jul 2 1992;358(6381):15-16.
106. Clarke MA, Cheung LC, Castle PE, Schiffman M, Tokugawa D, Poitras N, Lorey T, Kinney W, Wentzensen N. Five-Year Risk of Cervical Precancer Following p16/Ki-67 Dual-Stain Triage of HPV-Positive Women. *JAMA oncology.* Oct 11 2018.
107. Belletti B, Baldassarre G. Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets.* Nov 2011;15(11):1249-1266.
108. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene.* Dec 5 1996;13(11):2323-2330.
109. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* Mar 2000;182(3):311-322.

Literaturverzeichnis

110. Areal-Cuns C, Mercado-Gutierrez M, Paniello-Alastruey I, Mallor-Gimenez F, Cordoba-Iturriagoitia A, Lozano-Escario M, Santamaria-Martinez M. Dual staining for p16/Ki67 is a more specific test than cytology for triage of HPV-positive women. *Virchows Arch. Nov 2018*;473(5):599-606.
111. Watt PM, Hickson ID. Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem. J. Nov 1 1994*;303 (Pt 3):681-695.
112. Kearsley SE, Labib K. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta. Jun 16 1998*;1398(2):113-136.
113. Zheng J. Diagnostic value of MCM2 immunocytochemical staining in cervical lesions and its relationship with HPV infection. *Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2015*;8(1):875-880.
114. Steinau M, Rajeevan MS, Unger ER. DNA and RNA references for qRT-PCR assays in exfoliated cervical cells. *J. Mol. Diagn. Feb 2006*;8(1):113-118.
115. Scerri J, Baldacchino S, Saliba C, Scerri C, Grech G. Bead-based RNA multiplex panels for biomarker detection in oncology samples. *Methods. Oct 22 2018*.
116. Hannemann PVF. Entwicklung und Machbarkeitsnachweis eines Luminex-basierten, QuantiGene HPV-E7 mRNA genotypisierenden Nachweisverfahrens / vorgelegt von Paul Viktor Felix Hannemann. Berlin, Berlin; 2019.
117. Nevermann N. Von Morphologie zu Molekularbiologie: Charakterisierung HPV-induzierter zervikaler Läsionen auf der Basis einer quantitativen, mRNA-basierten Messung zellulärer und viraler Biomarker : ein diagnostischer Paradigmenwechsel? / vorgelegt von Nora Franziska Nevermann. Berlin, Berlin; 2019.
118. Basten M. mRNA-basierte Quantifizierung von Biomarkern zur Diagnostik von zervikalen intraepithelialen Neoplasien und von Zervixkarzinomen : Validierung des QuantiGene (R) 2.0 Plex Assays / vorgelegt von Mirka Basten. Berlin, Berlin; 2019.
119. Radde K, Gottschalk A, Bussas U, Schulein S, Schriefer D, Seifert U, Neumann A, Kaiser M, Blettner M, Klug SJ. Invitation to cervical cancer screening does increase participation in Germany: Results from the MARZY study. *Int. J. Cancer. Sep 1 2016*;139(5):1018-1030.
120. Liang LA, Einzmann T, Franzen A, Schwarzer K, Schauburger G, Schriefer D, Radde K, Zeissig SR, Ikenberg H, Meijer CJ, Kirkpatrick CJ, Kolbl H, Blettner M, Klug SJ. Cervical Cancer Screening: Comparison of conventional Pap smear test, liquid-based cytology and human papillomavirus testing as stand-alone or co-testing strategies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. Nov 13 2020*.
121. User Manual QuantiGene Plex Assay. Affymetrix Inc. 2014; https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/QuantiGene_Plex_User_Manual.pdf. Accessed 03.12.2018.
122. Bio-Plex® 200 Systems. Bio-Rad Laboratories, Inc. <https://www.bio-rad.com/de-de/product/bio-plex-200-systems?ID=715b85f1-6a4e-41b3-b5d9-80202d779e13>. Accessed 08.04.2021.
123. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020; <https://www.R-project.org/>.
124. Revelle W. psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research. Northwestern University, Evanston, Illinois. 2020; <https://CRAN.R-project.org/package=psych>.
125. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics. Mar 1977*;33(1):159-174.
126. Stevenson M, Sergeant E, with contributions from, Nunes T, Heuer C, Marshall J, Sanchez J, Thornton R, Reiczigel J, Robison-Cox J, Sebastiani P, Solymos P, Yoshida K, Jones G, Pirikahu S, Firestone S, Kyle R,

Literaturverzeichnis

- Popp J, Jay M, Reynard C. *epiR: Tools for the Analysis of Epidemiological Data*. R package version 2.0.19. 2021; <https://CRAN.R-project.org/package=epiR>.
- 127.** Schwarzer G, Türp JC, Antes G. Wahrscheinlichkeitsverhältnis (Likelihood Ratio) - Alternative Sensitivität und Spezifität. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 2002;12/2002.
- 128.** Canty A, Ripley B. *boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions*. R package version 1.3-25. 2020.
- 129.** Davison AC, Hinkley DV. *Bootstrap Methods and Their Applications*. . Cambridge University Press. Cambridge 1997.
- 130.** Gordon M, Lumley T. *forestplot: Advanced Forest Plot Using 'grid' Graphics*. R package version 1.10.1. 2020; <https://CRAN.R-project.org/package=forestplot>.
- 131.** de Thurah L BJ, Lam JUH, Rebolj M. Concordant testing results between various human papillomavirus assays in primary cervical cancer screening: systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017;24(1):29-36.
- 132.** Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlee F, Franco EL, Canadian Cervical Cancer Screening Trial Study G. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* Oct 18 2007;357(16):1579-1588.
- 133.** Petry KU, Menton S, Menton M, van Loenen-Frosch F, de Carvalho Gomes H, Holz B, Schopp B, Garbrecht-Buettner S, Davies P, Boehmer G, van den Akker E, Iftner T. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br. J. Cancer.* May 19 2003;88(10):1570-1577.
- 134.** Schneider A, Hoyer H, Lotz B, Leistritz S, Kuhne-Heid R, Nindl I, Muller B, Haerting J, Durst M. Screening for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int. J. Cancer.* Nov 20 2000;89(6):529-534.
- 135.** Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, de Sanjose S, Naucler P, Lloveras B, Kjaer S, Cuzick J, van Ballegooijen M, Clavel C, Iftner T, Joint European Cohort S. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ.* Oct 13 2008;337:a1754.
- 136.** Stoler MH, Schiffman M, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study G. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA.* Mar 21 2001;285(11):1500-1505.
- 137.** Wright TC, Ronnett BM, Kurman RJ, Ferenczy A. Precancerous Lesions of the Cervix. In: Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM, eds. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Boston, MA: Springer US; 2011:193-252.
- 138.** Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int. J. Gynecol. Pathol.* Apr 1993;12(2):186-192.
- 139.** Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M. The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnoses: an ALTS report. *Am. J. Clin. Pathol.* May 2007;127(5):805-815.
- 140.** Badr RE, Walts AE, Chung F, Bose S. BD ProEx C: a sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix. *Am. J. Surg. Pathol.* Jun 2008;32(6):899-906.
- 141.** Wu R, Belinson SE, Du H, Na W, Qu X, Wu R, Liu Y, Wang C, Zhou Y, Zhang L, Belinson JL. Human papillomavirus messenger RNA assay for cervical cancer screening: the Shenzhen Cervical Cancer Screening Trial I. *Int. J. Gynecol. Cancer.* Nov 2010;20(8):1411-1414.

Literaturverzeichnis

142. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Gadag V, Holloway G, Bartellas E, Kum N, Giede C, Lear A. Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. *J. Clin. Microbiol.* Feb 2011;49(2):557-564.
143. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer.* Sep 23 2011;11(10):726-734.
144. Schmitz M, Eichelkraut K, Schmidt D, Zeiser I, Hilal Z, Tettenborn Z, Hansel A, Ikenberg H. Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages. *BMC Cancer.* Dec 3 2018;18(1):1197.
145. Baldacchino S, Saliba C, Scerri J, Scerri C, Grech G. Optimization of a Multiplex RNA-based Expression Assay Using Breast Cancer Archival Material. *J Vis Exp.* Aug 1 2018(138).
146. Del Pino M, Svanholm-Barrie C, Torne A, Marimon L, Gaber J, Sagasta A, Persing DH, Ordi J. mRNA biomarker detection in liquid-based cytology: a new approach in the prevention of cervical cancer. *Mod. Pathol.* Feb 2015;28(2):312-320.
147. Bourmenskaya O, Shubina E, Trofimov D, Rebrikov D, Sabdulaeva E, Nepsha O, Bozhenko V, Rogovskaya S, Sukhikh G. Host gene expression profiling of cervical smear is eligible for cancer risk evaluation. *J. Clin. Pathol.* Apr 2013;66(4):282-285.
148. Gebärmutterhalskrebs-Früherkennung - Neues organisiertes Programm im Überblick. 2021; https://www.kbv.de/media/sp/Praxisinfo_Fr_erkennung_Geb_rmutterhalskrebs.pdf. Accessed 19.05.2021.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nicole Schäfer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Vergleich des QuantiGene-Molecular-Profiling Histology-Tests mit Zervixkarzinom-Screeningmethoden an einer Probenauswahl der populationsbasierten MARZY-Studie“ (*„Comparison of the QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology Assay with Cervical Cancer Screening Methods on a Selected Sample of the Population-Based MARZY Study“*) 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe. Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn PD Dr. Andreas M. Kaufmann für die Bereitstellung des Projekts bedanken, das mir den Einstieg in die wissenschaftliche Arbeit ermöglicht hat. Ich bedanke mich v. a. für seine stets kompetente, hilfsbereite, fördernde und motivierende Unterstützung. Sein Engagement für die Wissenschaft war für mich von Beginn an mitreißend und hat mir die nötige Energie für meine Arbeit verliehen.

Für die Einarbeitung und die immer herzliche und kollegiale Unterstützung bedanke ich mich bei Anna Sophie Skof, Sarah Thies und Ursula Schiller. Ihre konstruktiven Ratschläge und die Beantwortung meiner vielen Fragen waren eine große Hilfe.

Weiterhin geht mein Dank an Frau Prof. Klug und ihr Team für die Bereitstellung der MARZY-Proben und -Daten. Insbesondere gilt mein Dank Sarah Tegenfeldt und Dr. Gunther Schauburger für die konstruktive Zusammenarbeit bei der Erstellung meines Studienkollektivs und der statistischen Auswertung. Ohne diese gute Kooperation wäre das Projekt nicht realisierbar gewesen.

Für die statistischen Erklärungen und die Beratung möchte ich auch Frau Anne Pohrt meinen Dank aussprechen.

Ich danke der FAZIT-Stiftung für die finanzielle Unterstützung während meiner Zeit im Labor sowie für die Finanzierung meiner Kongressteilnahme, bei der ich mein Projekt einem internationalen Fachpublikum vorstellen durfte.

Für das Korrekturlesen und die anregenden und inspirierenden Diskussionen danke ich von ganzem Herzen meinem Vater, Dr. Hans Joachim Schäfer und meinem Lebenspartner, Felix Zimmerlein.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, meinen Lebenspartner, meine Schwester mit Mann und meine Großeltern, die mir jederzeit mit motivierenden und ermutigenden Gesprächen zur Seite standen. Sie und ihre stets liebevolle Unterstützung haben es mir ermöglicht, da zu stehen, wo ich heute stehe.



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Name, Vorname: Schäfer, Nicole
Emailadresse: nicole.schaefer@charite.de
Matrikelnummer: 219038
PromotionsbetreuerIn: PD Dr. Andreas Kaufmann
Promotionsinstitution / Klinik: Charité Gynäkologische
Tumorimmunologie, Frauenklinik

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Nicole Schäfer innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

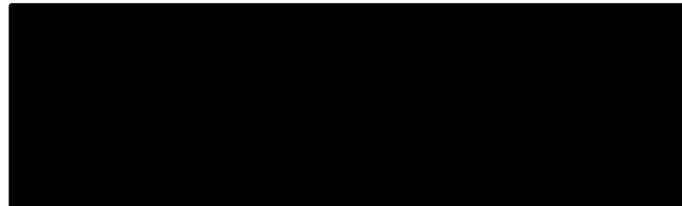
- *Termin 1: 20.05.2021*
- *Termin 2: 21.05.2021*

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- *Auswertung ist bereits erfolgt, umfangreiche deskriptive Analysen.*
- *Tabellen übersichtlich gestalten*

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 21.05.2021



Unterschrift Beraterin, Institutsstempel