

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

DISSERTATION

**Evaluation von Onkoproteintests als molekulare Triage-
Tests im Zervixkarzinomscreening**

**Evaluation of oncoprotein based tests as molecular triage
tests in the cervical cancer screening program**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Sophia Ossmann

aus Schwandorf, Bayern

Datum der Promotion: 03. März 2023

INHALTSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Formelverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
Zusammenfassung	11
Abstract (englisch)	12
1 Überblick über Problemgeschichte und aktuellen Forschungsstand	13
1.1 Über Disziplingrenzen hinweg: Wie Mikrobiologie und Epidemiologie die Karzinogenese des Zervixkarzinoms erforschten	13
1.2 Das humane Papillomvirus und seine onkogenen Mechanismen	15
1.2.1 Der virale Lebenszyklus	18
1.2.2 Die Rolle der viralen Onkoproteine.....	20
1.2.3 Von der Infektion zum Krebs.....	24
1.3 Maßnahmen zur Prävention des Zervixkarzinoms	28
1.3.1 Primärprävention durch Impfung.....	29
1.3.2 Sekundärprävention durch Screening	30
2 Fragestellung	37
3 Material und Methoden	39
3.1 Probenkollektive	39
3.1.1 Patientinnenauswahl und -rekrutierung	39
3.1.2 Probengewinnung.....	42
3.1.3 Verblindung.....	42
3.1.4 Klinische Daten.....	43
3.2 Zellkultur	43

3.3	HPV-Typ-Bestimmung	44
3.3.1	Multiplexed Genotyping.....	44
3.3.2	BD Onclarity™ HPV-Test.....	44
3.4	Durchführung der Onkoproteintests	45
3.4.1	OncoE6™ Cervical Test.....	45
3.4.2	<i>recomWell</i> HPV 16/18/45.....	49
3.5	Verwendete Geräte und Materialien	57
3.6	Statistische Methoden	60
4	Ergebnisse	64
4.1	Vorbereitende Experimente mit dem <i>recomWell</i> HPV 16/18/45	64
4.1.1	Reduktion des Probenvolumens	64
4.1.2	Evaluation des Einflusses zurückbleibenden ThinPrep®s.....	66
4.1.3	Validierung des Washergeräts.....	68
4.2	Ergebnisse der Messung verschiedener Patientinnenkohorten	68
4.2.1	Ergebnisse aus der Pilot-Kohorte	68
4.2.2	Ergebnisse aus der Screeningkohorte.....	74
4.2.3	Ergebnisse aus der Referral-Kohorte	78
5	Diskussion.....	92
5.1	Hypothesenbezogene Ergebnisdiskussion.....	93
5.1.1	Design der Testsysteme	94
5.1.2	Die diagnostische Wertigkeit der Tests	97
5.1.3	Der Zeit- und Arbeitsaufwand	101
5.1.4	Der Kostenaufwand.....	105
5.2	Limitationen der erzielten Ergebnisse	106
5.2.1	Limitationen in der präanalytischen Phase.....	106
5.2.2	Limitationen in der analytischen Phase	108
5.2.3	Limitationen in der postanalytischen Phase	109

5.3	Vergleich mit ähnlichen Studien	110
5.3.1	Vergleich der Ergebnisse des <i>recomWell</i> HPV 16/18/45 mit Ergebnissen anderer Studien	111
5.3.2	Vergleich der Ergebnisse des OncoE6™ Cervical Tests mit Ergebnissen anderer Studien	114
5.4	Abschließende Beurteilung und Ausblick	115
	Literaturverzeichnis	119
	Eidesstattliche Versicherung	133
	Lebenslauf	134
	Danksagung	136
	Bescheinigung der akkreditierten Statistikerin	137

Für meine Omas, meine Mutter und meine Schwester.

*Meine starken Vorbilder, die mich ermutigt haben, bis hierher zu gehen
und mit deren Unterstützung ich immer weiter gehe.*

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Inkubationszeiten des Teststreifens im OncoE6™ Cervical Test in Abhängigkeit der Raumtemperatur	47
Tabelle 2: Eingesetzte Zellzahlen in Scale-Down-Experimenten mit dem <i>recomWell</i> HPV 16/18/45 mit Zellen aus Zellkultur	52
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial und Geräte für die Testung des <i>recomWell</i> HPV 16/18/45	58
Tabelle 4: Reagenzien und mitgelieferte Materialien der <i>recomWell</i> HPV 16/18/45 Testung in der Reihenfolge ihrer Verwendung	59
Tabelle 5: Reagenzien und mitgelieferte Materialien der Testung mit dem OncoE6™ Cervical Test Testung in der Reihenfolge ihrer Verwendung	59
Tabelle 6: Beschreibung der Studienpopulation der Pilotkohorte nach histologischen Gruppen und gesamt	69
Tabelle 7: Sensitivität und Spezifität des <i>recomWell</i> HPV 16/18/45 in der Pilot-Kohorte	71
Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität des OncoE6™ Cervical Tests in der Pilot-Kohorte	72
Tabelle 9: Sensitivität und Spezifität in der Pilot-Kohorte nach Kombination der Ergebnisse von OncoE6™ Cervical Test und <i>recomWell</i> HPV 16/18/45	73
Tabelle 10: Beschreibung der Studienpopulation der Screeningkohorte nach histologischen Gruppen und gesamt	75
Tabelle 11: Sensitivität und Spezifität des <i>recomWell</i> HPV 16/18/45 in der Screeningkohorte bei Einschluss von Patientinnen mit unauffälliger Kolposkopie	77
Tabelle 12: Sensitivität und Spezifität des <i>recomWell</i> HPV 16/18/45 in der Screeningkohorte bei Einschluss lediglich Patientinnen mit gesicherter Histologie...	78
Tabelle 13: Beschreibung der Studienpopulation der Referral-Kohorte nach histologischen Gruppen und gesamt	79
Tabelle 14: Gegenüberstellung von Sensitivität und Spezifität des <i>recomWell</i> HPV 16/18/45 für Proben mit < 3 mL Probenmaterial und für solche mit \geq 3 mL;	81
Tabelle 15: Sensitivität und Spezifität des <i>recomWell</i> HPV 16/18/45 in der Referral-Kohorte	82

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 16: Sensitivität und Spezifität des <i>recomWell</i> HPV 16/18/45 in der Referral-Kohorte stratifiziert nach vorliegendem HPV-Typ.....	83
Tabelle 17: Sensitivität und Spezifität des <i>recomWell</i> HPV 16/18/45 in der Referral-Kohorte stratifiziert nach Probenalter.....	84
Tabelle 18: Sensitivität und Spezifität des OncoE6™ Cervical Tests in der Referral-Kohorte.....	87
Tabelle 19: Sensitivität und Spezifität des OncoE6™ Cervical Tests in der Referral-Kohorte stratifiziert nach vorliegendem HPV-Typ.....	88
Tabelle 20: Sensitivität und Spezifität für den OncoE6™ Cervical Test in der Referral-Kohorte stratifiziert nach Probenalter.....	89
Tabelle 21: Sensitivität und Spezifität in der Referral-Kohorte nach Kombination der Ergebnisse	90
Tabelle 22: Sensitivität und Spezifität der untersuchten Onkoproteintests im Vergleich zum BD Onclarity™ HPV-Test	97

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 A: Papillomviruspartikel, B: Genom des HPV 16.....	16
Abbildung 2: Typ-spezifische HPV-Prävalenz in invasiven Zervixkarzinomen in verschiedenen geographischen Regionen.....	17
Abbildung 3: Lebenszyklus einer mit HPV infizierten Zelle	19
Abbildung 4: Interaktionen der viralen Onkoproteine mit Zellzyklus regulierenden Proteinen; A: Einfluss des Onkoproteins E6, B: Einfluss des Onkoproteins E7	21
Abbildung 5: Schritte der Krebsentstehung nach Infektion der Zervix mit HPV	24
Abbildung 6: Durchschnittliche Entwicklung von Persistenz, Progression und Clearance von onkogenen HPV-Infektionen.....	25
Abbildung 7: Kumulative Inzidenz von CIN3 oder Zervixkarzinom über einen Zeitraum von 10 Jahren abhängig von HPV-Status bei Studieneinschluss	27
Abbildung 8: Zervixabstriche nach Papanicolaou-Färbung, A: Zervixabstrich mit physiologischem Zellbild B: Zervixabstrich mit pathologischem Zellbild	32
Abbildung 9: Klassifikationssystem der Ergebnisse aus dem Pap-Abstrich.....	33
Abbildung 10: Abklärungsalgorithmus für das kombinierte Zervixkarzinomscreening für Frauen ab 35 Jahren seit 2020	34
Abbildung 11: Flowchart zum Einschluss der Patientinnen aus der Greco-Self-Studie in die Screeningkohorte	41
Abbildung 12: Probenvorbereitung für den OncoE6™ Cervical Test.....	46
Abbildung 13 A: Beispiel für ein Testergebnis aus dem OncoE6™ Cervical Test dreier Patientinnen B: Farbskala zur Auswertung der Linienintensität der Testeinheit	48
Abbildung 14: Probenvorbereitung für den <i>recomWell</i> HPV 16/18/45.....	50
Abbildung 15: Vorbereitung der Proben für die ThinPrep®-Rücklauf-Experimente	54
Abbildung 16: Darstellung der Veränderung der durchschnittlichen Extinktionen bei Zugabe verschiedener Mengen an ThinPrep®.....	67

FORMELVERZEICHNIS

Formel 1: Formeln zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität der Onkoproteintests, **A:** Sensitivität und Spezifität für einzelne Dysplasiegrade, **B:** Sensitivität und Spezifität für zusammengefasste Dysplasiegrade.....62

Formel 2: Formel zur Berechnung der korrigierten Extinktion von Proben mit < 3 mL Probenmaterial81

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
CIN2+	Dysplasien von Grad CIN2 und höher (CIN2, CIN3, Carcinoma in situ, invasives Karzinom)
CIN3+	Dysplasien von Grad CIN3 und höher (CIN3, Carcinoma in situ, invasives Karzinom)
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
E6-AP	E6-assoziierte Proteine
EBM	Einheitlicher Bewertungsmaßstab
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GBA	Gemeinsamer Bundesausschuss
GoÄ	Gebührenordnung für Ärzte
HPV	Humanes Papillomvirus
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
HSV-2	Herpes-simplex-Virus-2
IFCPC	International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy
LEEP	Loop Electrosurgical Excision Procedure
LSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion
mAK	Monoklonaler Antikörper
pRb	Retinoblastom-Protein

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Die Entwicklung eines Zervixkarzinoms ist in den meisten Fällen von einer Infektion mit dem humanen Papillomvirus (HPV) begleitet. Daher gehört der Nachweis viralen Genmaterials seit dem Jahr 2020 zum Früherkennungsprogramm für Gebärmutterhalskrebs in Deutschland. Da eine Infektion mit dem HPV allerdings ohnehin weit verbreitet ist, in den meisten Fällen aber nicht zur Dysplasie führt, ist die Aussagekraft dieses Tests eingeschränkt. Neue molekulare Diagnosemethoden bieten die Möglichkeit, anhand des Nachweises von Virusproteinen eine Aussage über das Vorliegen einer Dysplasie zu treffen. Das diagnostische Potential dieser Methoden ist allerdings noch unklar. Zwei der neuen Methoden, die HPV-Onkoproteine nachweisen, werden hier auf ihre Wertigkeit überprüft.

Methoden: Es wurden Zervixabstriche von Frauen aus drei verschiedenen Kohorten untersucht: Eine Pilot-Kohorte (n = 39), eine Screeningkohorte (n = 64) und eine Referral-Kohorte (n = 330). Der hier untersuchte ELISA *recomWell* HPV 16/18/45 wurde an allen drei Kohorten und der Lateral-Flow-Test OncoE6™ Cervical Test an der Pilot- und der Screeningkohorte eingesetzt. Dabei wurden Sensitivität und Spezifität sowie die Übereinstimmung der beiden Tests bestimmt. Potentielle Einflussfaktoren wie die Lagerungsdauer der Proben oder der Einfluss des Lagerungsmediums auf die Testprozedur wurden gesondert untersucht.

Ergebnisse: Die Sensitivität des *recomWell* HPV 16/18/45 für eine Dysplasie vom Grad CIN2+ lag in der Referral-Kohorte bei 31,0 %, bei einer Spezifität von 79,3 %. Der OncoE6™ Cervical Test erkannte Dysplasien vom Grad CIN2+ in der gleichen Kohorte mit einer Sensitivität von 70,7 % und einer Spezifität von 67,1 %. In 158 von 295 Fällen (53,6 %) ergaben beide Onkoproteintests das gleiche Ergebnis. In 89,4 % der konkordant positiven Ergebnisse lag ein Dysplasiegrad CIN2+ vor.

Diskussion: Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Onkoproteintests dem aktuellen diagnostischen Standard hinsichtlich Sensitivität und Spezifität unterlegen sind. Aus diesen Ergebnissen kann weder eine Empfehlung für die Aufnahme in das primäre Zervixkarzinomscreening noch für den Einsatz als Triage-Test abgeleitet werden.

ABSTRACT (ENGLISCH)

Background: In the majority of cases the development of cervical cancer is associated with an infection with human papillomaviruses. Therefore, detection methods of viral genetic material were implemented into the German cervical cancer screening program in 2020. However, since the infection with human papillomaviruses is extremely common and doesn't lead to dysplasia in most cases, the clinical value of these methods for the detection of dysplasia is limited. New diagnostic methods approach the detection of dysplasia by quantifying viral oncoproteins. The diagnostic potential of these methods remains uncertain. Two of these innovative methods are here being tested and validated.

Methods: Cervical swabs of women of three different cohorts were used in this study: One pilot cohort (n = 39), one screening cohort (n = 64) and one referral cohort (n = 330). The ELISA *recomWell* HPV 16/18/45 was used in all three cohorts and the lateral flow assay OncoE6™ cervical test was used in the pilot cohort and in the referral cohort. Sensitivity and specificity as well as the concordance of the two test results were evaluated. Time of storage, potential impact of storage medium and other factors which could possibly influence the results, were evaluated in a separate analysis.

Results: The *recomWell* HPV 16/18/45 detected dysplasia of CIN2+ with a sensitivity of 31,0% in the referral cohort and with a specificity of 79,3%. In the same cohort sensitivity of the OncoE6™ cervical Test for dysplasia CIN2+ was 70,7% and specificity was 67,1%. Both oncoprotein tests showed a concordant result in 158 out of 295 cases (53,6%). In 89,4% of the concordant positive results there was a dysplasia of grade CIN2+.

Discussion: The results of this study demonstrate that oncoprotein tests are inferior to the current standard of care in terms of sensitivity and specificity. Based on these results no recommendation can be made for their inclusion in primary cervical cancer screening programs nor for the implementation as a triage test.

1 ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND AKTUELLEN FORSCHUNGSSTAND

1.1 ÜBER DISZIPLINGRENZEN HINWEG: WIE MIKROBIOLOGIE UND EPIDEMIOLOGIE DIE KARZINOGENESE DES ZERVIXKARZINOMS ERFORSCHTEN

Auf der Suche nach der Ursache für das Zervixkarzinom verfolgte die Medizin lange Zeit unterschiedliche Hypothesen. Die dabei erreichten Ergebnisse erlaubten über eine Kombination epidemiologischer und mikrobiologischer Methoden Einblicke in zentrale Zusammenhänge der Karzinogenese.

Erste Hinweise auf diese Zusammenhänge entdeckte Dr. Domenico Antonio Rigoni-Stern im Jahr 1842. Der italienische Arzt untersuchte Sterbeurkunden von Frauen in den Jahren 1760-1839 und analysierte sie in Hinblick auf die Prävalenzen verschiedener Krebsarten. Dabei fiel ihm auf, dass Krebs der Gebärmutter bei Nonnen weitaus seltener auftrat als bei verheirateten Frauen. Rigoni-Stern vermutete, dass ausgedehnte Fastenperioden oder die Körperhaltung der Ordensfrauen beim Beten diesen Unterschied erklären könnten (Rigoni-Stern, 1842). Die spätere Forschung folgte ihm darin nicht. Sie stellte fest, dass die Wahrscheinlichkeit, Gebärmutterkrebs zu entwickeln, zwar mit der Lebensform der Nonnen zusammenhängt. Weniger die von Rigoni-Stern vermuteten Gewohnheiten schienen aber ursächlich zu sein, als vielmehr deren Sexualverhalten. Bis heute gilt: Während Nonnen und verheiratete Frauen ein geringes bzw. moderates Risiko für Gebärmutterhalskrebs aufweisen, ist die Gefahr für Prostituierte besonders hoch (Sebastian et al., 1978). Von manchen Autoren als Urvater der epidemiologischen Forschung gefeiert (Scotto und Bailar, 1969), eröffnete Rigoni-Stern mit seinen Erkenntnissen das Feld für die Suche nach den Hintergründen für seine Feststellung. Der beobachtete Häufigkeitsunterschied wurde zunächst auf mechanische Irritationen wie Geburten oder Geschlechtsverkehr zurückgeführt (Towne, 1955). Doch bald fanden andere Autoren weitere Erklärungen. So versuchte die Forschungsgruppe um Fraumeni et al. die Beobachtungen Rigoni-Sterns zu reproduzieren, indem sie 1969 eine Gruppe von 31.000 Nonnen einer Vergleichsgruppe aus der Allgemeinbevölkerung gegenüberstellte. Zwar zeigte sich auch hier der Prävalenzunterschied, den der italienische Kollege festgestellt hatte, doch zogen diese Autoren andere Schlüsse aus den Ergebnissen. Weniger das

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

zölibatäre Leben an sich als ein „Umweltfaktor im Zusammenhang mit Geschlechtsverkehr“ sei dafür verantwortlich (Fraumeni et al., 1969).

Um diesen Umweltfaktor näher zu bestimmen, nutzten viele Forschungsgruppen erneut die Verfahrensweisen Rigoni-Sterns. Sie verwendeten epidemiologische Methoden und erwarteten den Hinweis auf ein Agens zu finden, das Mikrobiologen anschließend als das gesuchte Karzinogen bestätigen würden. Diese Arbeitsteilung erwies sich allerdings als nicht erfolgreich: So wurde zwar wiederholt gezeigt, dass bei Patientinnen mit Gebärmutterhalskrebs häufig besonders hohe Antikörpertiter für das Herpes-simplex-Virus 2 (HSV-2) vorliegen (Adam et al., 1974; Naib et al., 1969). Doch selbst unter äußerst sensitiven Bedingungen konnten Mikrobiologen die DNA des Virus im Tumorgewebe nicht nachweisen (Wolf et al., 1975). Um ein infektiöses Agens als Ursache einer Krankheit zu belegen, fordert das erste Koch'sche Postulat die Isolation des Infektionserregers aus dem erkrankten Gewebe (Evans, 1976). Da diese Forderung für HSV-2 nicht erfüllbar ist, kann bezweifelt werden, dass dieses Virus krankheitsursächlich ist.

Selbst am Nachweis der HSV-2-DNA gescheitert, verband der Virologe Harald zur Hausen 1982 Erkenntnisse aus Epidemiologie und Mikrobiologie und brachte so eine andere Virusgruppe ins Spiel: die Familie des humanen Papillomvirus. Deren Biologie enthält tumorigene Eigenschaften; als Ursache gutartiger Wucherungen, sogenannter Condylome, waren sie zu diesem Zeitpunkt bereits etabliert. Da diese Viren durch Geschlechtsverkehr übertragen werden, passten sie zudem epidemiologisch ins Bild. (Shah et al., 1980; zur Hausen, 1982). Außerdem beobachtete zur Hausen, dass Menschen, die an Condylomen litten, häufiger genitale Karzinome entwickelten (zur Hausen, 1976). Anders als die DNA des HSV-2 konnte die der humanen Papillomviren im Zervixtumorgewebe nachgewiesen werden (Durst et al., 1983). Heutzutage ist dieser Nachweis weltweit Bestandteil der Krebsdiagnostik (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020).

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

Um die tatsächliche Kausalität zwischen Virusinfektion und Krebsentstehung beweisen zu können, müssten Probanden einer potentiellen Krebsquelle ausgesetzt werden. Es versteht sich von selbst, dass sich diese Versuche aus ethischen Gründen verbieten. Doch sprechen sowohl Epidemiologie als auch Mikrobiologie der Virusinfektion stark für die Hypothese, dass die meisten Zervixkarzinome auf eine HPV-Infektion zurückgehen:

- In über 99 % der Tumoren ist HPV-DNA nachweisbar (Walboomers et al., 1999).
- Infektion und Tumor teilen identische Risikofaktoren (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2007; Kaderli et al., 2014; Peyton et al., 2001).
- Proteine des Virus sind potente Karzinogene (Hawley-Nelson et al., 1989).

Daher sind Infektionen mit humanen Papillomviren heutzutage als der wichtigste Risikofaktor und die Hauptursache für die Entstehung von Zervixkarzinomen anerkannt (Aviles, 2015; Pfister, 2012).

1.2 DAS HUMANE PAPILLOMVIRUS UND SEINE ONKOGENEN MECHANISMEN

Das humane Papillomvirus bildet die eigene Familie der Papillomaviridae. Viren dieser Virusfamilie sind unbehüllt und besitzen ein etwa 55 nm großes ikosaedrisches Kapsid (Abbildung 1 A). Im Inneren dieses Kapsids befindet sich das Virusgenom, eine doppelsträngige zirkuläre DNA von etwa 8 kbp (Doorbar et al., 2015). Die proteinkodierenden Sequenzen der DNA werden entsprechend dem Zeitpunkt ihrer Expression in zwei Gruppen aufgeteilt. Man unterscheidet „Early-Gene“ (E1,2,4-7), die zur Regulation der DNA-Replikation früh im viralen Lebenszyklus exprimiert werden, von „Late-Genen“ (L1, L2), die später exprimiert werden und für virale Kapsidproteine kodieren (Abbildung 1 B; de Villiers et al., 2004).

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

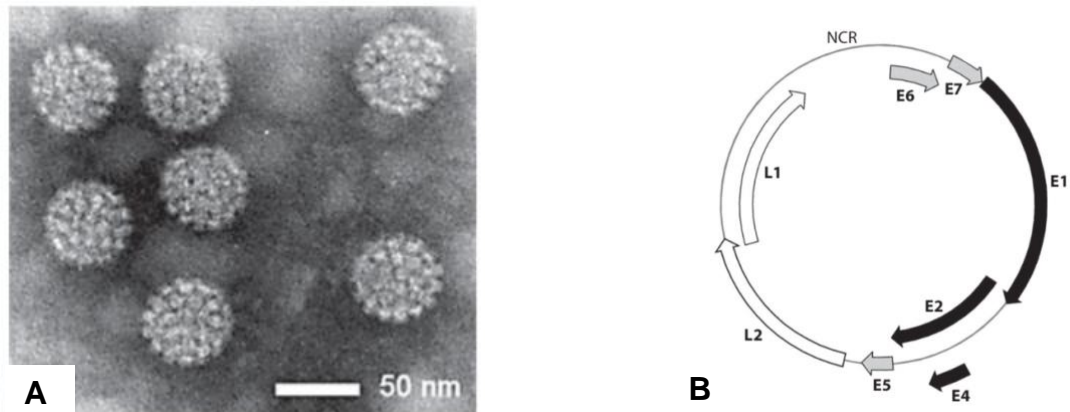


Abbildung 1 A: Papillomviruspartikel, elektronenmikroskopische Aufnahme; **B: Genom des HPV 16**, schematische Darstellung der proteinkodierenden Sequenzen, NCR = noncoding region, für Replikation, Transkription und Virusfreisetzung kodierende Gene in Schwarz, Onkogene in Grau, für Strukturproteine kodierende Gene in Weiß, *modifiziert nach Pfister, 2012*

Anhand ihrer Genomsequenz für das Strukturprotein L1 werden derzeit 206 verschiedene Typen humaner Papillomviren unterschieden. Sie alle befallen das Epithel von Haut und Schleimhaut und rufen dort Warzen, Papillome und flache Dysplasien hervor. Bestimmte dieser papillomatösen Wucherungen neigen dazu, sich zu einem malignen Tumor zu entwickeln (de Villiers et al., 2004). Nach ihrem Risiko, eine maligne Transformation zu induzieren, werden die humanen Papillomviren in „low-risk“- bzw. „high-risk“-Typen unterschieden. Dabei wird der Großteil der Infektionen durch einige wenige Vertreter verursacht. Demnach lassen sich in rund 90 % der gutartigen genitalen Warzen die HPV-Typen 6 und 11 nachweisen, die den „low-risk“-Typen zugeordnet werden (Aubin et al., 2008; Park et al., 2014). In invasiven zervikalen Tumoren hingegen finden sich in ca. 70 % der Fälle die „high-risk“-HPV-Typen 16 und 18, wobei die Häufigkeitsverteilung geographisch leicht variiert (Abbildung 2; Smith et al., 2007). Neben Zervixkarzinomen sind auch Karzinome des Anus (Alemany et al., 2015), der Vulva (de Sanjose et al., 2013), der Vagina (Alemany et al., 2014), des Penis (Alemany et al., 2016) sowie des Oropharynx (Castellsague et al., 2016) in unterschiedlichen Häufigkeiten mit HPV assoziiert.

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

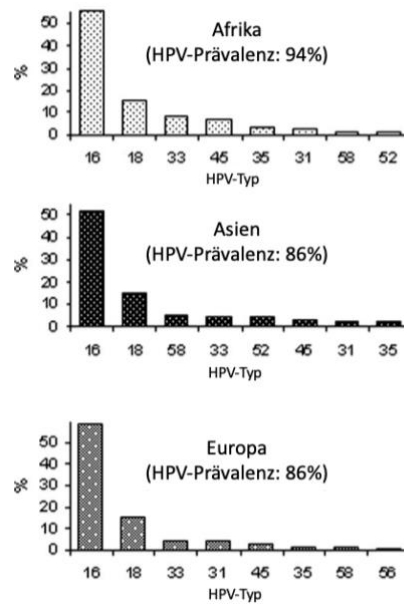


Abbildung 2: Typ-spezifische HPV-Prävalenz in invasiven Zervixkarzinomen in verschiedenen geographischen Regionen, modifiziert nach Smith et al., 2007

1.2.1 DER VIRALE LEBENSZYKLUS

Das HPV wird durch direkten Haut- oder Schleimhautkontakt von Mensch zu Mensch übertragen. Mit seinem Kapsidprotein L1 bindet das Virus an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) aus der epithelialen Basalmembran, die infolge kleiner Traumata freigelegt werden (Joyce et al., 1999). Solche Traumata können beispielsweise beim Geschlechtsverkehr oder durch eine Rasur entstehen. Die Bindung von L1 an HSPG bewirkt eine Konformationsänderung im Viruskapsid. Dabei wird eine zuvor verborgene Domäne des Kapsidproteins L2 freigelegt und von Proteasen des Wirtsorganismus gespalten. Diese Spaltung hat zur Folge, dass die Affinität des Virus zu HPSG abnimmt und das Virus an zelluläre Rezeptoren binden kann (Kines et al., 2009; Schiller et al., 2010). Humane Papillomviren verfügen mit Ausnahme des E1 Proteins, das eine Helikase-Aktivität besitzt, nicht über selbstcodierte DNA-Replikationsenzyme. Sie sind daher auf die enzymale Ausstattung der Wirtszelle angewiesen. Im Rahmen der Wundheilung wandern Zellen ein, die rasch proliferieren, um die Wunde zu verschließen. Diese Zellen weisen ein besonders aktives Replikationssystem auf und bieten dem Virus damit optimale Bedingungen für seine Vervielfältigung (Moody und Laimins, 2010). Nachdem das Virus an die Zelle gebunden hat, wird es endozytotisch aufgenommen. Anschließend wird die Virus-DNA aus dem Endosom freigesetzt und zum Nukleus transportiert, wo sie zunächst als Episom persistiert (Siddiqi et al., 2018). Kurz nach der Infektion repliziert das Virus und etabliert eine geringe Kopiezahl extrachromosomal (Pyeon et al., 2009).

Teilt sich die infizierte Zelle, so werden zelluläre und virale DNA gemeinsam vervielfältigt. Das Virusgenom wird anschließend auf die beiden neu entstandenen Tochterzellen aufgeteilt. Während eine der beiden Zellen als epitheliale Stammzelle basal verbleibt und proliferiert, wandert die andere Zelle in Richtung Epitheloberfläche, differenziert und proliferiert. In basalen Zellen werden virale Proteine in sehr geringer Menge exprimiert. In der differenzierenden Zelle hingegen steigt die HPV-Proteinexpression, sobald die Zelle höhere Epithelschichten erreicht (Abbildung 3). Dies ist einer der Immunevasionsmechanismen des HPV. Denn in diesem Kompartiment sind Proteine für Immunzellen weniger zugänglich, wodurch die Virusinfektion wesentlich schlechter vom Immunsystem erkannt werden kann (Frazer, 2009).

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

Mit der Wanderung der Wirtszelle verändert sich das Expressionsmuster des Virusgenoms. Während in unteren Schichten ausschließlich die Proteine der „Early-Gene“ produziert werden, werden in oberen Schichten die „Late-Gene“ exprimiert. Da Epithelzellen nur in der Basalschicht proliferieren, besitzen suprabasale Zellen keine Replikationsenzyme. Mittels des E7-Proteins induziert das HPV daher zum einen die Expression dieser Enzyme (Cheng et al., 1995). Zum anderen hält das Virus die Wirtszellen in einer stetigen S-Phase, sodass das Virusgenom vervielfältigt werden kann. Wandert die differenzierende Zelle weiter nach oben, werden schließlich die Kapsidproteine L1 und L2 produziert und die Virusbestandteile werden assembliert (Abbildung 3; Stanley, 2010). Die superfiziellen Epithelzellen sind mit neuen Virionen gefüllt und können, wenn sie abgeschilfert werden, neue Gewebe infizieren.

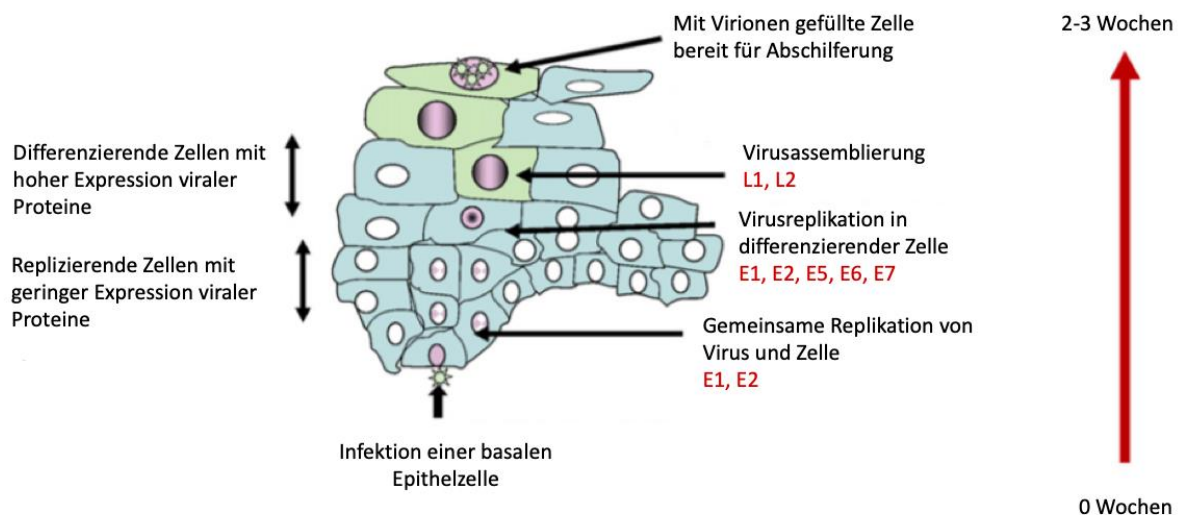


Abbildung 3: Lebenszyklus einer mit HPV infizierten Zelle. Exprimierte Virusproteine in Rot; geringe Virusreplikation und Expression von viralen Early-Proteinen nach Infektion einer basalen Zelle, höhere Virusreplikation und Expression von Early-Proteinen in der differenzierenden und nach superfiziell aufsteigenden Zelle, Expression von Late-Proteinen und Assemblierung der Virusbestandteile in den obersten Zellschichten, passive Virusfreisetzung durch Abschilferung der Epithelzelle, *modifiziert nach Stanley, 2010*

1.2.2 DIE ROLLE DER VIRALEN ONKOPROTEINE

Ein wichtiger Bestandteil der HPV-vermittelten Transformation ist die Störung des Zellzyklus. Das HPV bewirkt, dass die Zelle stetig proliferiert. Diese Funktion wird durch die viralen Onkoproteine E6 und E7 vermittelt, die damit einen zentralen Punkt in der Karzinogenese einnehmen. Es sind zahlreiche Wege bekannt, auf denen die Onkoproteine die Wirtszelle beeinflussen. Eine umfassende Übersicht liefert die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2007). Um grundlegende Zusammenhänge zu verdeutlichen, seien hier je zwei weithin bekannte sowie zwei weniger geläufige Interaktionen der Onkoproteine beschrieben.

E6 und E7 werden bei den „high-risk“-HPV-Typen aus einer einzigen polycistronischen mRNA exprimiert. Sie unterliegen dadurch der Kontrolle eines gemeinsamen Promoters (Seedorf et al., 1987; Smotkin et al., 1989). Wird E6 exprimiert, steigt damit die Wahrscheinlichkeit, dass E7 ebenfalls exprimiert wird und sich die beiden Proteine in ihrer onkogenen Wirkung ergänzen können.

Das E7-Protein

Die am besten charakterisierten Bindungspartner des E7 sind das Retinoblastom-Protein (pRb) und seine Familie, die „Pocket Proteine“. Namensgebend für diese Proteinfamilie ist die Taschenstruktur, mit der Zielmoleküle gebunden werden. Eines dieser Moleküle ist der Transkriptionsfaktor E2F. Dieser beeinflusst die Transkription von Zyklinen, welche den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus ermöglichen (Muller et al., 2001). Im Komplex mit dem pRb ist E2F inaktiv. Bindet jedoch das virale E7-Protein an pRb, so fällt dessen Inhibition auf E2F weg (Abbildung 4; Chellappan et al., 1992). Der Transkriptionsfaktor E2F kann die Transkription seiner zellulären Zielgene initiieren und die Zelle kann in die S-Phase eintreten. Regionen des E7-Proteins, die pRb destabilisieren, können auch effektiv die anderen Mitglieder der Pocket Protein Familie regulieren (Helt und Galloway, 2001).

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

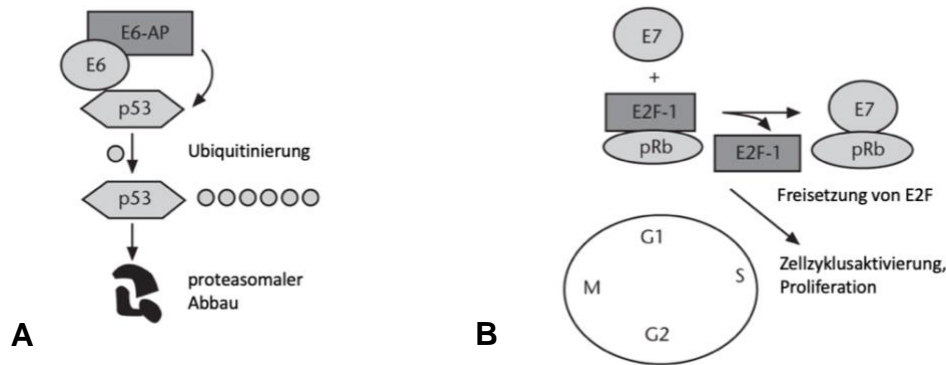


Abbildung 4: Interaktionen der viralen Onkoproteine mit Zellzyklus regulierenden Proteinen; A: Einfluss des Onkoproteins E6: Ubiquitinierung und nachfolgender Abbau des Tumorsuppressors p53 nach Bindung des Onkoproteins E6 und E6-assoziiierter Proteine (E6-AP); **B: Einfluss des Onkoproteins E7:** Freisetzung des E2F-Proteins infolge der Bindung des Onkoproteins E7 an pRb, Wirkung des E2F-Proteins als Transkriptionsfaktor zur Transkription von Genen der Zellzyklusaktivierung und Proliferation, *modifiziert nach Avci, 2012*

Das E6-Protein

Da sich im Rahmen der Tumorprogression vermehrt Mutationen im zellulären Genom ansammeln (Duensing und Munger, 2002), gewinnt das Tumorsuppressorprotein p53 an Bedeutung. Aufgabe des p53 ist es, bei Genschädigung, wie sie das HPV induzieren kann, den Zellzyklus anzuhalten oder den programmierten Zelltod einzuleiten. Die Relevanz des p53 im Rahmen einer HPV-Infektion kann sehr eindrucksvoll in Experimenten gezeigt werden: Werden Zellen mit dem viralen E7-Protein immortalisiert, steigt der p53-Spiegel an (Demers et al., 1994).

In einer ruhenden Zelle ist p53 nur in geringer Menge vorhanden, da es stetig durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird (Kubbutat et al., 1997; Reich und Levine, 1984). Akkumulieren jedoch DNA-Schäden, so bleibt p53 erhalten. Als Transkriptionsfaktor kann es einerseits das Ablesen von Genen der DNA-Reparaturmaschinerie induzieren, um diese Schäden auszubessern. Ist der Defekt der DNA zu groß, kann p53 andererseits die Gentranskription von Aktivatoren der Apoptose aktivieren und damit den programmierten Zelltod einleiten (Levine, 1997).

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

Das virale E6 induziert den Abbau des p53, indem es im Verbund mit anderen Proteinen (E6-AP) zu einer Ubiquitin-Ligase komplexiert. Dieser Komplex kann das p53 mit Ubiquitin markieren und den Abbau durch das Proteasom ermöglichen (Abbildung 4; Scheffner et al., 1993).

Epigenetische Mechanismen

Weitaus weniger bekannt ist, wie die viralen Onkoproteine epigenetisch wirken. Beschrieben sind Einflüsse sowohl von E6 als auch E7 (Duenas-Gonzalez et al., 2005).

Zum einen beeinflusst E7 den Acetylierungszustand von Histonen, die die DNA im Zellkern verpacken. Sind Histone acetyliert, so binden sie die DNA schwächer. Transkriptionsfaktoren können dadurch leichter an die DNA binden und die Transkription induzieren, was für die Zellteilung notwendig ist. Das virale E7-Protein kann auf verschiedene Arten eine stärkere Acetylierung bewirken. Dabei wirkt es sowohl fördernd auf Acetyltransferasen, die Acetylgruppen anfügen (Avvakumov et al., 2003), als auch hemmend auf Histondeacetylasen, die die Acetylgruppen entfernen (Brehm et al., 1999). Zum anderen wirken Onkoproteine auf das Methylierungsmuster des Genoms. Durch Methylierung ihrer Promotoren kann die Transkription von bestimmten Genen unterdrückt werden. Sowohl E6 als auch E7 wirken auf Methyltransferasen, welche Methylgruppen an Cytosinnukleotiden der Promotor-DNA übertragen und damit diese Gene stilllegen (Au Yeung et al., 2010; Burgers et al., 2007). Ziele der Methylierung sind dabei Gene der Wirtszelle wie des Virus (Hansel et al., 2014; Turan et al., 2006). Abschnitte im Wirtsgenom, die häufig methyliert sind, kodieren für Proteine, die Apoptose induzieren (Shivapurkar et al., 2004) oder für Tumorsuppressorproteine (Wong et al., 1999). Methylierungen im Virusgenom werden für verschiedene proteinkodierende Bereiche beschrieben. Dabei ist das Muster der Methylierung abhängig vom Dysplasiegrad verschieden. In einer 2009 veröffentlichten Studie untersuchte das Forschungsteam um Brandsma et al. die Virus-DNA aus Zervixabstrichen auf Methylierungen. Je nach Dysplasiegrad des Abstriches konnten hierbei verschiedene Methylierungsmuster unterschieden werden. Hatte eine Patientin keine oder eine niedriggradige Dysplasie, so wies das virale Genom in ihrem Abstrich keine oder eine nur geringe Methylierung auf. Methylgruppen fanden sich in dieser Gruppe vor allem an den Genen für E1 und E6. Abstriche von Patientinnen mit einer höhergradigen Läsion zeigten starke Methylierung im Bereich der Gene für E5, L1 und L2 (Brandsma et al., 2009).

1.2.3 VON DER INFektion ZUM KREBS

Die Entwicklung von der HPV-Infektion hin zum invasiven Karzinom kann in die vier Abschnitte Infektion, Persistenz, Progression und Invasion eingeteilt werden (Abbildung 5; Schiffman et al., 2007). Es wird angenommen, dass alle HPV-assoziierten Zervixkarzinome jeden dieser Abschnitte durchlaufen. Ein Zurück auf eine vorherige Stufe ist jedoch in jedem der drei ersten Abschnitte möglich.

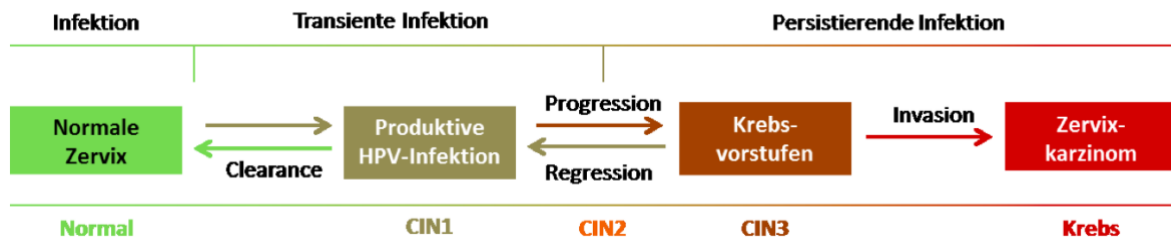


Abbildung 5: Schritte der Krebsentstehung nach Infektion der Zervix mit HPV, aus Leitlinienprogramm Onkologie, 2020, modifiziert nach Schiffman und Wentzensen, 2013

Infektion

Die Infektion mit dem HPV ist die häufigste sexuell übertragbare Virusinfektion weltweit (World Health Organization, 2019). Bei Frauen ist die Infektion besonders unter sexuell aktiven jungen Frauen verbreitet. In der Gruppe der Frauen unter 25 Jahren beträgt die Prävalenz bis zu 50 %, in höheren Altersgruppen fällt sie auf Werte um 10 % (Pfister, 2012). Das Risiko der HPV-Infektion nimmt mit der Anzahl der Sexualpartner zu. Bei monogam lebenden Frauen steigt das Infektionsrisiko auch mit der Anzahl der Beziehungen des Partners außerhalb der Partnerschaft (Ho et al., 1998).

Die meisten Infektionen bleiben symptomlos. Nach einem Jahr sind ca. 70 % der HPV-Infektionen nicht mehr nachweisbar (Abbildung 6), was als „Clearance“ bezeichnet wird (Ho et al., 1998). Ob das Virus dadurch vollständig eliminiert wird oder die Virusreplikation auf einem kleinen Level unter der Nachweisgrenze zurückbleibt, ist unklar. Die Tatsache, dass im Rahmen einer erworbenen Immundefizienz typspezifische HPV-Infektionen wieder neu auftreten, spricht jedoch für Letzteres (Strickler et al., 2005).

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

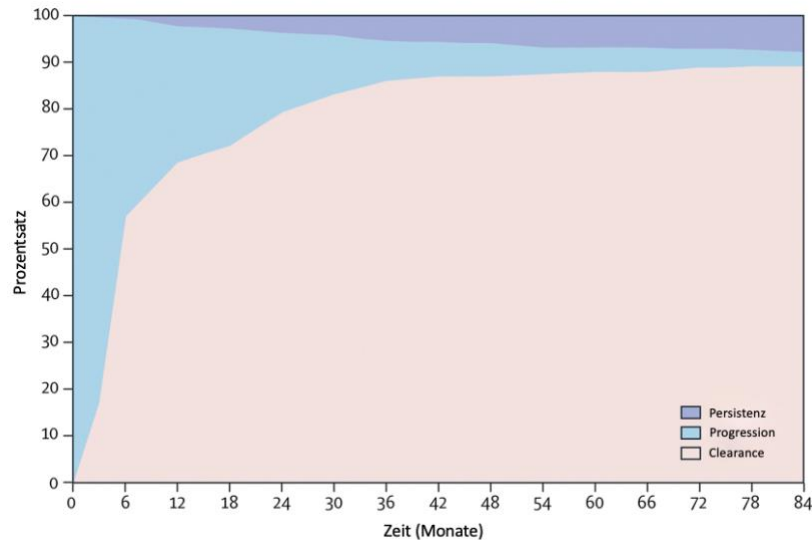


Abbildung 6: Durchschnittliche Entwicklung von Persistenz, Progression und Clearance von onkogenen HPV-Infektionen über einen Zeitraum von 84 Monaten, modifiziert nach Schiffman et al., 2007

Persistenz

Ab wann eine Infektion als persistent gilt, ist in der Literatur nicht einheitlich definiert. Kann ein Virustyp 12-18 Monate nach erster Detektion immer noch nachgewiesen werden, so wird jedoch zumeist von Viruspersistenz gesprochen. Eine persistente Virusinfektion ist der prognostisch zuverlässigste Risikofaktor für die Entstehung von Epitheldysplasien, die als Krebsvorstufe gelten (Sotlar, 2008). Es ist nicht vollständig geklärt, warum eine Infektion persistiert. Höhere Raten von Viruspersistenz bei HIV-positiven Patienten lassen darauf schließen, dass ein Versagen der T-Zell-vermittelten Immunität dazu beiträgt (Ahdieh et al., 2000; Strickler et al., 2005).

Progression

Zeigt das persistent infizierte Epithel dysplastische Veränderungen, so befindet es sich in der Phase der Progression zum Karzinom. Meist finden sich diese Veränderungen an der sogenannten Transformationszone, an der das Plattenepithel der vaginal liegenden Ektozervix in das Zylinderepithel der supravaginalen Endozervix übergeht. Auf molekularer Ebene zeigt sich, dass die virale Proteinexpression nicht mehr von der Differenzierung der Epithelzellen abhängig ist: Die Onkoproteine E6 und E7 werden auch in basalen Schichten des Gewebes stärker exprimiert. Zellen, die aus diesen Teilungen hervorgehen, reifen nicht mehr aus und ersetzen das gesunde Epithel. Diese Dysplasien werden als zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) bezeichnet.

Ob und wann eine CIN entsteht, ist abhängig von dem persistierenden HPV-Typ. Besonders häufig und besonders früh zeigen sich Dysplasien bei persistenter Infektion mit HPV 16, wo erste histologische Veränderungen bereits nach wenigen Monaten auftreten (Abbildung 7; Khan et al., 2005a). Bei der Untersuchung von Faktoren, die für eine maligne Transformation prädisponieren, wird häufig nicht zwischen Risikofaktoren für Persistenz oder solchen für Progression unterschieden. Einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben unter anderem Rauchen (McIntyre-Seltman et al., 2005), Multiparität (Munoz et al., 2002) und die Einnahme oraler Kontrazeptiva (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer et al., 2007). Außerdem wirkt sich ein niedriger sozioökonomischer Status negativ auf die Virusclearance aus (Singh GK, 2003). Dies gilt selbst für den Fall, dass die betroffene Frau regelmäßig an der Gesundheitsvorsorge teilnimmt (Khan et al., 2005b).

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

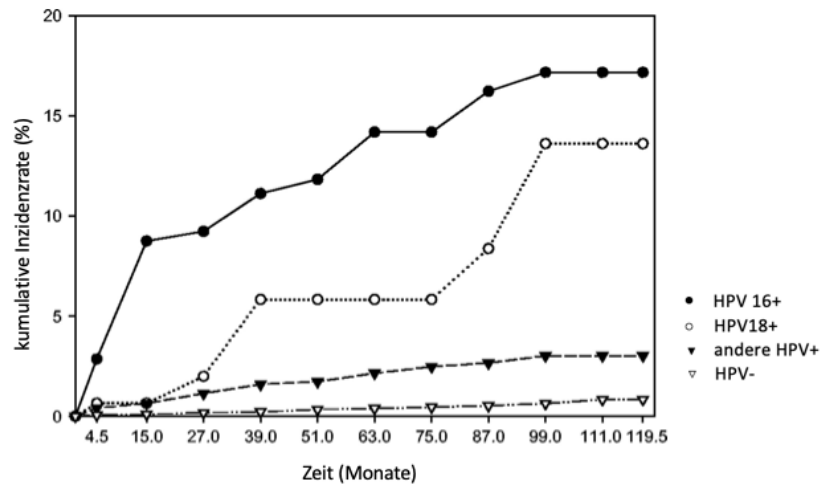


Abbildung 7: Kumulative Inzidenz von CIN3 oder Zervixkarzinom über einen Zeitraum von 10 Jahren abhängig von HPV-Status bei Studieneinschluss. Stärkster Anstieg der kumulativen Inzidenz bei Infektion mit HPV 16, gefolgt von Infektion mit HPV 18, wesentlich niedrigere Anstiege der Inzidenz bei Infektion mit anderen HPV-Typen oder bei fehlendem HPV-Nachweis, *modifiziert nach Khan et al., 2005a*

Invasion

Bleibt eine Zervixdysplasie über lange Zeit untherapiert, so kann sie sich zum invasiven Karzinom entwickeln. Der genaue Zeitraum bis zur Transformation ist bislang nicht zuverlässig bestimmt, jedoch geben epidemiologische Beobachtungen immerhin grobe Anhaltspunkte: Während eine Präkanzerose in Deutschland durchschnittlich im Alter von 34 Jahren diagnostiziert wird, liegt das mittlere Alter bei Erstdiagnose eines Zervixkarzinoms bei 53 Jahren (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017).

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

Es ist nicht vollständig geklärt, welche Schritte für die maligne Transformation notwendig sind. Dass bei den meisten invasiven Krebsformen das virale Genom nicht mehr episomal vorliegt, sondern in das Wirtsgenom integriert ist, scheint pathogenetisch relevant zu sein (Peitsaro et al., 2002). Indem die mRNA der Onkoproteine stabilisiert wird, erfährt die Zelle einen Wachstumsvorteil (Jeon et al., 1995; Jeon und Lambert, 1995). Es ist zufällig, an welcher Stelle die ringförmige Virus-DNA geöffnet wird, sodass sie in die lineare Wirts-DNA integriert werden kann. Häufig findet der Bruch jedoch am E2-Gen statt (Collins et al., 2009). Die Wirkung des E2-Genprodukts, welches im normalen viralen Lebenszyklus eine Überexpression von E6 und E7 verhindert, fällt somit weg. Der Verlust dieser regulatorischen Komponente begünstigt dadurch die Immortalisierung der Zelle (Romanczuk und Howley, 1992).

Wie viele der hochgradigen Krebsvorstufen zum Karzinom werden, ist unbekannt. Retrospektive Kohortenstudien lassen einen Anteil von 20-30 % in 5 bis 10 Jahren vermuten (Chang, 1990; McCredie et al., 2008). In Deutschland sind die Inzidenzraten durch verbesserte Früherkennungsmaßnahmen im Trend rückläufig. Erkrankten 2002 noch 6.500 Frauen jährlich an einem Zervixkarzinom (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2006), so waren es 2014 nur noch 4.540 Frauen (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017).

1.3 MASSNAHMEN ZUR PRÄVENTION DES ZERVIXKARZINOMS

Um dem Zervixkarzinom vorzubeugen, gibt es in Deutschland zwei verschiedene Präventionsstrategien. Durch die seit 1971 durchgeführte Sekundärprävention mittels zytologischen Abstrichs ließ sich sowohl die Inzidenz des Karzinoms als auch die Mortalität der betroffenen Frauen senken (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2006). Eine weitere Senkung ist infolge der Primärprävention durch Impfung zu erwarten.

1.3.1 PRIMÄRPRÄVENTION DURCH IMPFUNG

Impfstoffe gegen HPV enthalten rekombinant hergestellte L1-Proteine, die sich zu nichtinfektiösen virusähnlichen Partikeln zusammenlagern. Im Rahmen der Immunantwort entstehen virusneutralisierende Antikörper gegen diese Proteine, die in das Genitalsekret abgegeben werden (Schwarz et al., 2010).

Der erste HPV-Impfstoff mit dem Namen Gardasil® wurde 2006 in der EU zugelassen und deckte die „high-risk“-Typen HPV 16 und 18 sowie die „low-risk“-Typen HPV 6 und 11 ab. Ein Jahr später wurde der Impfstoff Cervarix® zugelassen, der ausschließlich gegen die Typen HPV 16 und 18 gerichtet ist. Seit 2015 ist mit Gardasil 9® zudem ein Impfstoff verfügbar, der vor der Infektion mit den HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 schützt. Diese HPV-Typen verursachen 90 % aller Zervixkarzinome (Bujan Rivera und Klug, 2018; Wentzensen, 2016).

Aktuell empfiehlt das Robert-Koch-Institut eine Impfung von Mädchen und Jungen im Alter zwischen 9-14 Jahren. Nachholimpfungen sollen bis zum Alter von 17 Jahren erfolgen (Robert-Koch-Institut, 2019). Für einen effektiven Schutz ist es entscheidend, dass die Impfung vor Beginn der sexuellen Aktivität abgeschlossen ist (Kjaer et al., 2009).

Bislang konnte lediglich gezeigt werden, dass nach der Impfung die Vorstufen des Zervixkarzinoms deutlich seltener auftreten (Drolet et al., 2019; Kjaer et al., 2009). Seit Kurzem liegen jedoch erste Langzeitdaten zum Rückgang des Karzinoms selbst vor. In England, wo seit 2008 ein Schulimpfprogramm besteht, wurden bei geimpften Frauen bis zu 87 % weniger Zervixkarzinome beobachtet (Falcaro et al., 2021). Dennoch wird die Impfung in Deutschland eher zurückhaltend in Anspruch genommen. Unter jungen Mädchen waren bis Ende 2018 lediglich 51,1 % der 18-Jährigen vollständig geimpft (Siedler A und Rieck T, 2020).

1.3.2 SEKUNDÄRPRÄVENTION DURCH SCREENING

Ein Screeningprogramm für Gebärmutterhalskrebs besteht in Deutschland bereits seit 1971. Mit Beginn des Jahres 2020 wurde ein neuer Screeningalgorithmus eingeführt, welcher sich in einigen wesentlichen Punkten von seinen Vorgängern unterscheidet. Neben einer gezielten Anamnese und einer gynäkologischen Tastuntersuchung bleibt der zytologische Abstrich (Pap-Abstrich) als Teil des Programms bestehen. Neu ist nun zum einen, dass der Test auf HPV-Genmaterial (HPV-Test) in das Vorsorgeprogramm aufgenommen wurde. Die zweite Neuerung besteht darin, dass das Screening verschiedene Vorgehensweisen für Frauen im Alter von 20 bis 34 Jahren sowie für Frauen ab 35 Jahren vorsieht.

Frauen, die zwischen 20 und 34 Jahre alt sind, können eine Screeninguntersuchung pro Jahr wahrnehmen. Die Untersuchung besteht aus einer klinischen Untersuchung und einem Pap-Abstrich. Auffällige Befunde aus diesen Untersuchungen können durch einen HPV-Test abgeklärt werden. Durch das zweistufige Verfahren in dieser Alterskohorte vereint das Screeningprogramm Vorteile der Zytologie mit denen des HPV-Tests. Der HPV-Test zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität für zervikale Dysplasien aus. Vor dem 35. Lebensjahr ist eine HPV-Testung im Primärscreening nicht sinnvoll, da das Risiko einer benignen HPV-Infektion hoch, das Krebsrisiko jedoch verschwindend gering ist (Schiffman et al., 2007). Es ist daher sinnvoll, die zytologische Untersuchung, welche sich durch eine hohe Spezifität auszeichnet, dem HPV-Test vorzuschalten. So bleiben die nicht-karzinogenen transienten HPV-Infektionen unerkannt.

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

Für Frauen ab einem Alter von 35 Jahren ändert sich das Screeningschema. Sie haben dann alle drei Jahre Anspruch auf eine Kombinationsuntersuchung, die aus dem Pap-Abstrich und einem HPV-Test besteht. An auffällige Befunde aus Pap-Abstrich oder HPV-Test kann sich eine kolposkopische Untersuchung anschließen. Vor dem 30. Lebensjahr sind die meisten Frauen mit dem HPV in Kontakt gekommen, zu über 90 % heilen diese Infektionen aus (Ho et al., 1998). Daher besitzen Infektionen, die ab dem Alter von 35 Jahren bestehen, eine hohe Wahrscheinlichkeit für Persistenz und Progression (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2018b). Das Risiko einer hochgradigen Dysplasie ist für persistente Infektionen bis zu 800-fach höher als für transiente Infektionen (Pfister, 2012). Es ist daher sinnvoll, den HPV-Test in dieser Alterskohorte in das Primärscreening aufzunehmen (Bundesgesundheitsministerium, 2019).

Pap-Abstrich

Beim zytologischen Abstrich, dem sogenannten Pap-Abstrich, wird mithilfe eines Spatels der äußere Teil des Gebärmutterhalses abgestrichen, sodass sich Zellen ablösen. In einem zweiten Abstrich werden mittels einer Bürste, die in den Zervikalkanal eingeführt wird, endozervikale Zellen abgenommen. Spatel und Bürste werden dann auf einem Objektträger ausgestrichen und nach Fixierung und Färbung von einem Pathologen begutachtet (Abbildung 8).

Eine kostenaufwändigere Alternative stellt die Dünnschichtzytologie dar, bei der abgenommene Zellen zunächst in einem Fixationsmedium (z.B. ThinPrep® PreservCyt-Medium) ausgewaschen und dann auf den Objektträger übertragen werden. Da Zellen sich dabei weniger überlagern, können sie besser beurteilt werden. Eine systematische Gegenüberstellung zeigte jedoch, dass die Dünnschichtzytologie dem konservativen Verfahren hinsichtlich Sensitivität bei der Erkennung von Zervixkarzinomen bzw. Vorstufen nicht überlegen ist (Davey et al., 2006).

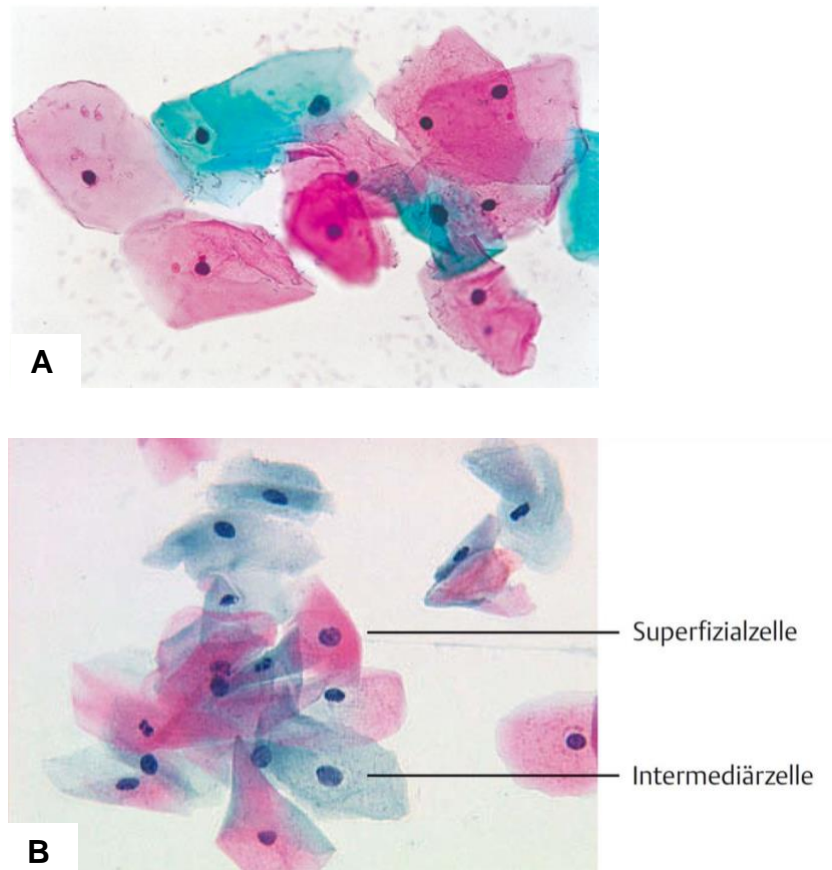


Abbildung 8: Zervixabstriche nach Papanicolaou-Färbung, A: Zervixabstrich mit physiologischem Zellbild, Superficialzellen und Intermediärzellen, entsprechend Pap I; B: Zervixabstrich mit pathologischem Zellbild, Dyskaryosen von Superficial- und Intermediärzellen, die der mittleren und oberen Zellschicht des Zervixepithels entstammen, entsprechend Pap III D, modifiziert nach Bubendorfer et al., 2011; Weyerstahl et al., 2013

Je nach Studie ist für den Pap-Abstrich eine Sensitivität von 30,0-87,0 % bei einer Spezifität von 86,0-100 % für zervikale Dysplasien beschrieben (Nanda et al., 2000). Als besonders fehlerträchtig gilt dabei die Abstrichentnahme selbst. Hinzu kommt, dass sich auch das Urteil des Pathologen als begrenzt verlässlich erwiesen hat (Marquardt, 2011; Stoler et al., 2001). Abgestrichene Zellen werden nach der Münchner Nomenklatur III (Abbildung 9) bzw. nach dem Bethesda-System klassifiziert. Bei auffälligen Befunden wird der Patientin eine weiterführende Diagnostik aus HPV-Test und Kolposkopie empfohlen (Bujan Rivera und Klug, 2018).

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

Münchener Nomenklatur III

Gruppe	Definition
0	Unzureichendes Material
I	Unauffällige und unverdächtige Befunde
II-a	Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese
II	Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert
II-p	Plattenepithelzellen mit geringergradigen Kernveränderungen als bei CIN, auch mit koilozytärem Zytoplasma/Parakeratose
II-g	Zervikale Drüsenzellen mit Anomalien, die über das Spektrum reaktiver Veränderungen hinausreichen
II-e	Endometriumzellen bei über 40-Jährigen in der zweiten Zyklushälfte
III	Unklare bzw. zweifelhafte Befunde
III-p	CIN 2/3/ Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen
III-g	Ausgeprägte Atypien des Drüsenepithels, Adenocarcinoma in situ/invasives Adenokarzinom nicht auszuschließen
III-e	Abnorme endometriale Zellen (insbesondere postmenopausal)
III-x	Zweifelhafte Drüsenzellen ungewissen Ursprungs
IIID	Dysplasiebefunde mit größerer Regressionsneigung
IIID1	Zellbild einer leichten Dysplasie analog CIN 1
IIID2	Zellbild einer mäßigen Dysplasie analog CIN 2
IV	Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms
IVa-p	Zellbild einer schweren Dysplasie/eines Carcinoma in situ analog zu CIN 3
IVa-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ
IVb-p	Zellbild einer CIN 3, Invasion nicht auszuschließen
IVb-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen
V	Malignome
V-p	Plattenepithelkarzinom
V-g	Endozervikales Adenokarzinom
V-e	Endometriales Adenokarzinom
V-x	Andere Malignome, auch unklaren Ursprungs

Abbildung 9: Klassifikationssystem der Ergebnisse aus dem Pap-Abstrich nach der 3. Auflage der Münchener Nomenklatur III, *aus Griesser et al., 2014*

HPV-Test

Durch HPV-Testung kann das Erbmateriale der humanen Papillomviren nachgewiesen werden, die als Hauptauslöser für Gebärmutterhalskrebs gelten (zur Hausen, 2002). Derzeit sind verschiedene HPV-Tests verfügbar, die sich im Testsystem, den erfassten HPV-Typen und dem ausgegebenen Ergebnis unterscheiden. So weisen einige Tests die DNA oder RNA der Onkoproteine E6 und E7 nach, andere die L1-DNA.

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

Das Ergebnis gibt die nachgewiesenen HPV-Typen zumeist in „high-risk“- und „low-risk“-positiv bzw. -negativ gruppiert an. Ein Rückschluss darauf, welcher HPV-Typ vorliegt, ist nur bei einzelnen Tests möglich. Der Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses zur Krebsfrüherkennungsrichtlinie von 2018 sieht vor, dass ausschließlich HPV-Tests mit einer Sensitivität von mindestens 90 % und einer Spezifität von mindestens 98 % eines etablierten und validierten HPV-Tests für den Nachweis von CIN2+ verwendet werden (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2018a). Ist der HPV-Test positiv, so wird der Patientin eine kolposkopische Untersuchung empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020).

Kolposkopie und Biopsie

Um auffällige Befunde aus Zytologie und HPV-Test abzuklären, gilt die kolposkopische Untersuchung mit Biopsie als Goldstandard (Abbildung 10).

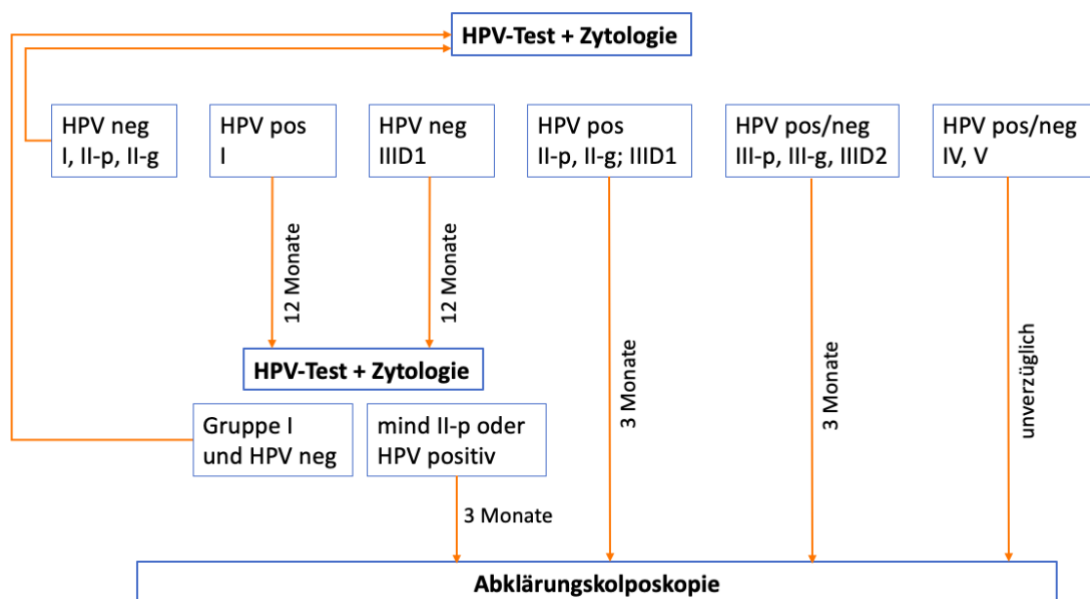


Abbildung 10: Abklärungsalgorithmus für das kombinierte Zervixkarzinomscreening für Frauen ab 35 Jahren seit 2020, modifiziert nach Gemeinsamer Bundesausschuss, 2018c

ÜBERBLICK ÜBER PROBLEMGESCHICHTE UND FORSCHUNGSSTAND

Durch das Kolposkop wird die Transformationszone bei bis zu 40-facher Vergrößerung begutachtet. Unter Zuhilfenahme von 3-5%iger Essigsäure und nachfolgend Lugolscher Lösung können Gewebsveränderungen sichtbar gemacht werden. Abnorme Befunde werden nach der kolposkopischen Nomenklatur der International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC) Rio 2011 eingeteilt. Demnach gelten leichte Veränderungen wie zartes essigweißes Epithel, zartes Mosaik oder zarte Punktierung als „minor changes“. Höhergradige Veränderungen wie intensives essigweißes Epithel, grobes Mosaik oder grobe Punktierung werden als „major changes“ bezeichnet. Eine scharfe Grenze zwischen einer Läsion und gesundem Gewebe (inner border sign), erhabene Bereiche an der Transformationszone (ridge sign), sowie Erosionen des Läsionsepithels (rag sign) gelten ebenso als pathognomonisch für hochgradige zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN; Vercellino et al., 2013).

Die kolposkopische Beurteilung ist als subjektives Verfahren lediglich begrenzt reproduzierbar und damit zur alleinigen Abklärung von auffälligen Vorbefunden nicht ausreichend. Sie wird daher um eine Biopsie aus dem Areal ergänzt, das kolposkopisch den höchsten Veränderungsgrad aufweist. Diese Biopsie wird anschließend histopathologisch beurteilt. Präkanzerosen der Zervix werden dabei in die CIN Grade 1-3 unterteilt. Während die CIN Grad 1 als Ausdruck einer transienten produktiven HPV-Infektion angesehen wird, gelten die CIN der Grade 2 und 3 als Präkanzerosen mit hohem Transformationspotential (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020).

Konisation

Wird eine Präkanzerose der Zervix histologisch bestätigt, so ist das weitere Vorgehen abhängig von deren Schweregrad. Dysplasien des Grades CIN1 und CIN2 werden zunächst nach sechs Monaten kolposkopisch und zytologisch reevaluiert, da sich viele der Vorstufen spontan zurückbilden (ca. 60 % der CIN1 in zwölf Monaten; Moscicki et al., 2004). Persistieren CIN1 oder CIN2 bzw. wird in der Biopsie eine CIN3 festgestellt, so ist eine operative Therapie der Läsion angeraten (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Therapie der Wahl ist dabei die Schlingen-Konisation (Loop Electrosurgical Excision Procedure, LEEP), bei der das suspekte Areal mittels einer elektrischen Schlinge entfernt wird.

Nach Konisation können Schwangerschaftskomplikationen wie Zervixinsuffizienz, Amnioninfektionssyndrom und Frühgeburtlichkeit häufiger auftreten (Kyrgiou et al., 2016). Daher ist die Indikation zur Konisation konsequent streng zu stellen und möglichst wenig Zervixgewebe zu entnehmen.

2 FRAGESTELLUNG

Die Einführung des HPV-Tests in das Zervixkarzinomscreening stellt eine grundlegende Veränderung des Vorsorgeprogramms dar. Lag der Fokus bisher auf der Früherkennung bereits bestehender Krebsvorstufen, setzt das Programm nun einen Schritt früher in der Karzinogenese an, indem es die krebsverursachende Infektion nachweist. Dass hierbei der epidemiologische Hintergrund der Krebsentstehung unberücksichtigt bleibt, erscheint allerdings bedenklich: Im Alter von 35 Jahren und darüber hinaus kommen unbedenkliche transiente HPV-Infektionen immer noch häufig vor. In Deutschland liegen bei rund sieben Prozent der Frauen mit HPV-Nachweis keine zytologische Auffälligkeiten vor (ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer, 2019). Es ist daher zu erwarten, dass viele Frauen, denen der HPV-Test angeboten wird, einen auffälligen Screeningbefund erhalten, obwohl keine behandlungsbedürftige Dysplasie vorliegt. Angesichts der begrenzten diagnostischen Wertigkeit (1.3.2) ist mit diesen Folgen auch zu rechnen, wenn eine zytologische Untersuchung mit dem HPV-Test kombiniert wird.

Die Nachricht, eine krebsverursachende Infektion in sich zu tragen, verunsichert viele Frauen. Da ihnen die Bedeutung eines positiven HPV-Nachweises häufig nur unzulänglich bekannt ist, leiden sie nicht nur an der Angst zu erkranken. Viele Frauen geben zudem an, sich schuldig und stigmatisiert zu fühlen, da sie ihr Sexualverhalten für die Infektion verantwortlich machen (McCaffery et al., 2006; O'Connor et al., 2014; Pirota et al., 2009).

Die Suche nach alternativen Diagnosemethoden scheint angesichts dieser Folgen dringlich angezeigt. In der Forschung wird eine Vielzahl von Methoden diskutiert. Einen Überblick über die in der Diskussion befindlichen Methoden geben Cuzick et al. in ihrer Veröffentlichung von 2012 (Cuzick et al., 2012). Die vorliegende Arbeit macht es sich zur Aufgabe, Onkoproteintests als Vertreter dieser innovativen Diagnosemethoden explorativ zu untersuchen. Die hinter diesen Tests stehende Logik macht sich den virusbedingten Ursprung der Karzinogenese zunutze: Entwickelt sich auf dem Boden einer HPV-Infektion eine Dysplasie, werden die viralen Onkoproteine E6 und E7 überexprimiert (Isaacson Wechsler et al., 2012). Wird eine erhöhte Menge dieser Onkoproteine im Zervixabstrich gemessen, erlaubt dies den Rückschluss auf eine zugrundeliegende Dysplasie.

FRAGESTELLUNG

Der Vorteil liegt auf der Hand: Während HPV-Tests lediglich nachweisen können, dass eine Infektion vorliegt, arbeiten Onkoproteintests einen Schritt präziser. Sie könnten anhand der Stärke der Expression der Proteine E6 und E7 zeigen, ob das Virus das Epithel bereits dysplastisch verändert hat. Die Onkoproteintests könnten damit die Trennschärfe in der Abgrenzung ungefährlicher transienter von behandlungsbedürftigen progredienten Infektionen erhöhen. Sie können folglich für den ärztlichen Befund potentiell aussagekräftiger und für die betroffenen Frauen weniger belastend sein.

Ob Onkoproteintests das Screening tatsächlich dahingehend bereichern können, soll in den dieser Dissertation zugrundeliegenden Hypothesen getestet werden: Dabei gilt als zentrale Hypothese: Onkoproteintests sind dem HPV-Test hinsichtlich Sensitivität und Spezifität für hochgradige Dysplasien nicht unterlegen. Im Falle der Verifikation können die oben beschriebenen Vorteile näher ausgelotet werden. Sollte sich diese Hypothese nicht verifizieren lassen, so wäre immerhin eine Nebenhypothese zu verfolgen. Als solche wird der Frage nachgegangen, ob Onkoproteintests einen Mehrwert als Abklärungstests (Triage-Tests) bieten können.

In dieser Arbeit sollen zwei kommerziell erhältliche Onkoproteintests auf ihre diagnostische Wertigkeit hin untersucht werden. Zum einen kommt der *recomWell* HPV 16/18/45 der Firma Mikrogen Diagnostik GmbH (Neuried, Deutschland) zum Einsatz, der das Onkoprotein E7 nachweist. Zum anderen wird der OncoE6™ Cervical Test der Arbor Vita Corporation (Fremont, CA, USA) angewendet, dessen Zielprotein das Onkoprotein E6 ist.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 PROBENKOLLEKTIVE

Um die Aussagekraft der Onkoproteintests in verschiedenen Settings zu untersuchen, wurden sie an unterschiedlichen Kohorten eingesetzt. An einer Pilot-Kohorte wurde zunächst die Durchführbarkeit der Experimente evaluiert. Anhand der nachfolgend beschriebenen „Greco-Self-Kohorte“ wurde anschließend die Aussage des *recomWell* HPV 16/18/45 für eine Screeningkohorte untersucht, die einen großen Anteil von dysplasiefreien Patientinnen enthielt. Die abschließend getestete „MolTriage-Kohorte“ stellt eine Referral-Kohorte dar, in die besonders viele Patientinnen mit Dysplasien eingeschlossen wurden. Der *recomWell* HPV 16/18/45 wurde an allen drei Kohorten eingesetzt. Aufgrund reduzierten Probenmaterials in der Screeningkohorte wurde der OncoE6™ Cervical Test lediglich in der Pilot- und der Referral-Kohorte angewendet. Alle drei Kohorten werden im Folgenden genauer beschrieben.

3.1.1 PATIENTINNENAUSWAHL UND -REKRUTIERUNG

Pilot-Kohorte und Patientinnen für vorbereitende Messungen

Aus der diagnostischen Laborroutine wurden ThinPrep®-Abstriche von Patientinnen ausgewählt, deren HPV-Status und Zervixhistologie zum Zeitpunkt der Testdurchführung bekannt war. Der HPV-Status wurde gemäß der 2008 durch die Arbeitsgruppe um Schmitt et al. vorgestellten Methode des Multiplexed Genotyping festgestellt (Schmitt et al., 2008). Abhängig vom Testdurchlauf wurden unterschiedliche Dysplasiegrade ausgewählt.

Für die Pilot-Kohorte (n = 39) wurden nur solche Patientinnen aufgenommen, die mit einem HPV-Typ infiziert waren, dessen Onkoproteine sowohl im *recomWell* HPV 16/18/45 als auch im OncoE6™ Cervical Test (HPV 16/18) nachweisbar sind. Außerdem wurde eine Gruppe von fünf Patientinnen ohne HPV-Infektion und ohne Dysplasie als Kontrolle eingeschlossen.

MATERIAL UND METHODEN

Alle Proben wurden von Ärztinnen und Ärzten der Charité – Universitätsmedizin Berlin im Rahmen der Dysplasiesprechstunde abgenommen. Die Patientinnen erteilten ihre schriftliche Einwilligung zur Weiterverwendung des Restmaterials der Untersuchung, indem sie dem Behandlungsvertrag der Charité – Universitätsmedizin Berlin zustimmten. Die Verarbeitung der Proben wurde durch das Ethikvotum mit der Nummer EA1/168/13 genehmigt. Die Abstriche wurden wie nachfolgend unter 3.1.2 angegeben abgenommen. Anschließend wurden die Proben pseudonymisiert und bis zur Austestung bei 8°C gelagert.

Screeningkohorte

Proben der Screeningkohorte wurden im Zeitraum von Mai 2016 bis November 2018, im Rahmen der Greco-Self-Studie (GREek CObas® SELF-sample) gesammelt (Agorastos et al., 2019). Eingeschlossene Probandinnen waren Frauen zwischen 18 und 75 Jahren, die in entlegenen griechischen Präfekturen lebten. Ausgeschlossen wurden schwangere Frauen.

Den Studienteilnehmerinnen wurde ein Instrument zur Verfügung gestellt, mit dem sie an sich selbst einen Zervixabstrich durchführen konnten. Dieser Abstrich wurde mittels Cobas® HPV-Test auf eine mögliche HPV-Infektion untersucht. Ließ sich dabei ein „high-risk“-HPV-Typ nachweisen, so wurde die Frau zu einer Abklärungskolposkopie eingeladen. War der kolposkopische Befund auffällig, wurde eine Biopsie entnommen.

Wenn die Patientin den Termin zur Kolposkopie wahrnahm, so wurde neben der Kolposkopie ein zytologischer Abstrich durchgeführt. Material aus diesem Abstrich wurde mittels Multiplexed Genotyping genotypisiert und in den vorliegenden Experimenten verwendet. Eingeschlossen waren dabei Patientinnen, die mit einem HPV-Typ infiziert waren, der im *recomWell* HPV 16/18/45 detektierbar war. Waren die Patientinnen mit mehreren HPV-Typen infiziert, wurden nur solche Patientinnen ausgewählt, bei denen der im *recomWell* HPV 16/18/45 nachweisbare HPV-Typ der Typ war, der in der Genotypisierung das stärkste Signal gab. Diese Kriterien trafen auf 64 der 773 Patientinnen, die zur Kolposkopie erschienen waren, zu. Es waren davon 35 Frauen in der Kolposkopie auffällig, bei 33 dieser Frauen wurde eine Biopsie entnommen und ein Histologieergebnis liegt vor.

MATERIAL UND METHODEN

Die Probenentnahme wurde durch das Ethikkomitee der Aristoteles Universität Thessaloniki (237/11.04.2016) und des Center for Research and Technology Hellas (ETH COM-9/09/11/2015) genehmigt. Einzelheiten zu Probenlagerung, Transport und HPV-Testung sowie zum Ablauf von Kolposkopie und Histopathologie können der Veröffentlichung der Greco-Self-Studie entnommen werden (Agorastos et al., 2019).

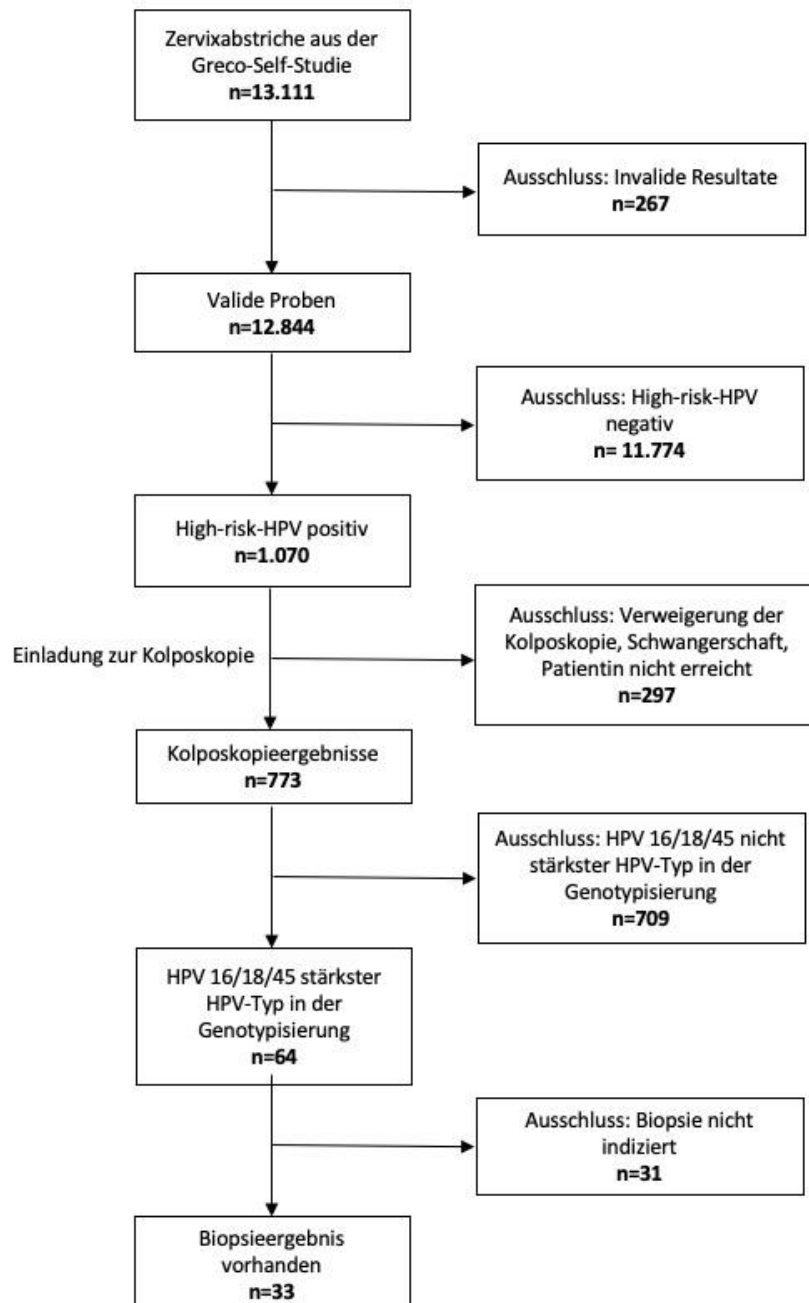


Abbildung 11: Flowchart zum Einschluss der Patientinnen aus der Greco-Self-Studie in die Screeningkohorte

Referral-Kohorte

Die 332 Abstriche der Referral-Kohorte wurden im Rahmen der Kooperationsstudie MolTriage (MOlecular TRIAGE) des Labors für Gynäkologische Tumorimmunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin mit dem Medizinischen Versorgungszentrum (MVZ) im Fürstenberg-Karree, Hohenzollerndamm 123, 14199 Berlin gewonnen. Die Probenentnahme und deren Bearbeitung wurde durch das Ethikvotum EA1/168/13 genehmigt. Im Zeitraum vom 01.10.2015 bis 02.11.2017 wurde Patientinnen der Dysplasiesprechstunde des MVZ angeboten, an der MolTriage-Studie teilzunehmen. Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war die schriftliche Einwilligung zur Teilnahme. Die Proben der Referral-Kohorte wurden bei 4°C aufbewahrt. Einmal im Monat wurden sie an das Labor für Gynäkologische Tumorimmunologie gesendet und vor der weiteren Verarbeitung pseudonymisiert.

3.1.2 PROBENGEWINNUNG

Das Probenmaterial, das im *recomWell* HPV 16/18/45 und im OncoE6™ Cervical Test Verwendung fand, wurde im Rahmen der zytologischen Untersuchung der Patientinnen gewonnen. Dazu wurde der äußere Gebärmuttermund mit einer Plastikbürste (Cervex-Brush®, Rovers Medical Devices, Oss, Niederlande) abgestrichen. Anschließend wurde die Bürste in der ThinPrep® PreservCyt-Lösung (Hologic Inc., Marlborough, MA, USA) ausgewaschen. Ein Teil dieser Lösung wurde für die zytologische Bestimmung der Pap-Stufe verwendet. Das verbliebene Material stand für die Onkoproteintests zur Verfügung.

3.1.3 VERBLINDUNG

Proben aus der Screeningkohorte sowie der Referral-Kohorte erreichten die Messlabore und Laboranten in pseudonymisierter Form und ohne Informationen über Alter und medizinische Vorgeschichte der Patientinnen. Mitgeteilt wurde lediglich, mit welchem HPV-Typ die Patientin infiziert war. Nach der Austestung der Proben wurden die Ergebnisse aus den Onkoproteintests mit den Daten aus den Patientinnenakten zusammengeführt.

MATERIAL UND METHODEN

3.1.4 KLINISCHE DATEN

Den Patientinnenakten der drei Kohorten wurden Daten bezüglich des Patientinnenalters, der zytologischen Diagnose sowie der histologischen Diagnose entnommen. Zusätzlich wurden die Befunde aus der kolposkopischen Untersuchung in die Analyse aufgenommen.

3.2 ZELLKULTUR

Für vorbereitende Messungen wurden Zellen der Karzinomzelllinien CaSki (HPV-16-positiv; ATCC® CRM-CRL-1550™), HeLa (HPV-18-positiv; ATCC® CRM-CRL-2™), Cerv 215 (HPV-45-positiv; RRID:CVCL_5722) und MS751 (HPV-45-positiv; ATCC® HTB-34™) verwendet.

Diese Zellen wurden zum einen von der Firma Mikrogen Diagnostik GmbH zur Verfügung gestellt. Zum anderen kamen Präparate zum Einsatz, die von Mitarbeitern des Labors für Gynäkologische Tumorummunologie hergestellt wurden. Beim Wachstum von Zellen aus Zellkultur wurde das Protokoll der American Type Culture Collection (ATCC) beachtet. Regelmäßige Kontrollen auf Verunreinigungen mit Mykoplasmen waren stets negativ (Venor GeM One Step Kit, Minerva Biolabs). Nach Abnahme aus dem Kulturmedium wurden die Zellen in ThinPrep® PreservCyt-Medium gelagert. Die Stabilität der HPV wurde regelmäßig durch HPV-DNA-Genotypisierung mittels Multiplexed Genotyping (DNA QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilgen, Deutschland) bestätigt. Nach Erntung der Zellen wurden sie in einer Konzentration von 10^6 Zellen/mL in ThinPrep®-Lösung suspendiert und lagerten bis zur Messung bei -20°C .

MATERIAL UND METHODEN

3.3 HPV-TYP-BESTIMMUNG

3.3.1 MULTIPLEXED GENOTYPING

Um den HPV-Typ der Proben aus vorbereitenden Messungen, Pilot-Kohorte und Screeningkohorte zu bestimmen, wurde die Technik der Broad Spectrum General Primer 5+/6+-Multiplex HPV-Genotypisierung (BSGP 5+/6+-MPG) eingesetzt. Dieses Verfahren wurde im Labor für Gynäkologische Tumorimmunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden dabei Sequenzen des L1 Gens verschiedener HPV-Typen durch PCR unter Anwendung von General Primern, die nicht HPV-Typ spezifisch waren, vervielfältigt. Die Genkopien wurden dann an magnetische Beads und Genotyp-spezifische Sonden gebunden. Nachdem diese Komplexe mit fluoreszierendem Farbstoff Streptavidin-konjugiertes R-Phycoerythrin (SAPE) angefärbt worden waren, konnten sie von Laser-basierten Read-Out (Luminex Reader, Bio-Plex® 200 System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Testung wurden in der Einheit Mean Fluorescence Intensity (MFI) ausgegeben.

3.3.2 BD ONCLARITY™ HPV-TEST

Der HPV-Typ von Patientinnen aus der Referral-Kohorte wurde durch den BD Onclarity™ HPV-Test (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) bestimmt. Dieser Test weist die DNA der viralen Onkoproteine E6 und E7 mittels Real-Time PCR nach und differenziert 6 HPV-Typen (16, 18, 45, 31, 51, 52) einzeln. Weitere „high-risk“-HPV-Typen wurden gruppiert nachgewiesen (33/58, 35/39/68, 56/59/66). Wenn ein HPV-Typ aus dieser Gruppe vorliegt, lautet das Ergebnis „high-risk-positiv“.

3.4 DURCHFÜHRUNG DER ONKOPROTEINTESTS

3.4.1 ONCOE6™ CERVICAL TEST

Testprinzip des OncoE6™ Cervical Tests

Der OncoE6™ Cervical Test funktioniert nach dem Prinzip eines Lateral-Flow-Tests. Zellen aus dem Zervixabstrich werden lysiert und in ein Gefäß gegeben, in dem monoklonale Antikörper (mAK) gegen das E6-Protein der HPV-Typen 16 und 18 lyophilisiert ist. Diese Antikörper sind mit dem Enzym alkalische Phosphatase (AP) konjugiert und binden das im Lysat enthaltene virale E6-Protein. In das beschichtete Gefäß wird der Teststreifen gegeben. Die Testlösung bestehend aus dem Lysat und den mAK wandert durch Kapillarkräfte die Nitrozellulosemembran des Teststreifens hinauf. Auf dem Teststreifen sind Antikörper in zwei Testlinien fixiert, die den Komplex aus E6-Protein und mAK binden. Eine der Testlinien bindet den Komplex des mAK mit dem HPV-16-E6-Protein, die andere den Komplex mit dem HPV-18-E6-Protein. Wird ein solcher Komplex erkannt, zeigt sich der Nachweis in einer violetten Färbung der Linie. Diese Farbreaktion wird durch die Reaktion der AP mit einem chromogenen AP-Substrat ausgelöst. Eine dritte Linie, die sich oberhalb der beiden Testlinien befindet, besteht aus Antikörpern gegen mAK und dient als interne Kontroll-Linie. Sie zeigt an, ob die Lösung durch den Teststreifen gewandert und der Test damit korrekt abgelaufen ist. Drei Teststreifen bilden eine Testeinheit, die damit die gleichzeitige Abarbeitung von drei Proben ermöglicht.

Probenvorbereitung für den OncoE6™ Cervical Test

Von in ThinPrep®-Lösung gelagerten Zervixabstrichen wurden nach kurzem Vortexen 2 mL Probenmaterial in ein 2 mL Eppendorf Tube transferiert und für 5 Minuten bei $>10.000 \times g$ zentrifugiert. Nachdem der Überstand mit einer Kolbenhubpipette entfernt worden war, wurden 930 μL Rinse Solution hinzugegeben. Das Tube wurde 5 Sekunden lang geschüttelt und für 5 Minuten bei $>10.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin entfernt, es wurden 372 μL Lysepuffer A hinzugegeben und unter kontinuierlicher Rotation bei 8 rpm in einem Rotator für 15 Minuten inkubiert. Es folgte die Zugabe von 35 μL Lysepuffer B und erneute 15-minütige Inkubation unter Rotation bei 8 rpm. Einen schematischen Überblick über die Probenvorbereitung gibt Abbildung 12.

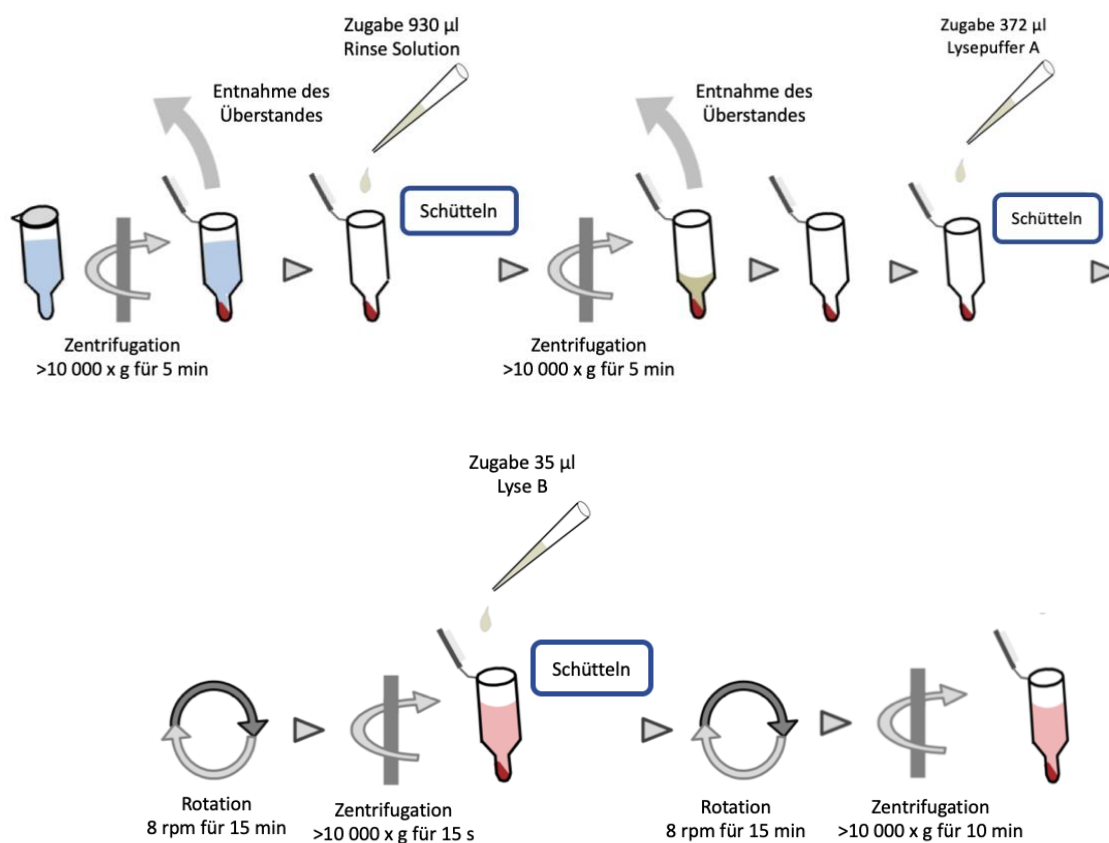


Abbildung 12: Probenvorbereitung für den OncoE6™ Cervical Test, modifiziert nach dem Benutzerhandbuch des OncoE6™ Cervical Tests der Arbor Vita Corporation Arbor Vita Corporation, 2019

Austestung des OncoE6™ Cervical Tests

Das Lysat wurde für 10 Minuten bei $>10.000 \times g$ zentrifugiert. Aus dem dadurch entstandenen Überstand wurden 200 μL abgenommen und in das mit Antikörpern beschichtete Detector Tube überführt. Das Detector Tube wurde für 5 Sekunden schnell im Kreis bewegt, um die lyophilisierten Antikörper zu lösen und sie mit dem Lysat zu vermischen. Nach fünfminütiger Inkubation wurde dieser Mischvorgang wiederholt. Die Testeinheit wurde in das Detector Tube überführt und für 55 Minuten bei Raumtemperatur für die Chromatographie inkubiert. Anschließend wurde die Testeinheit in ein Waschgefäß mit 200 μL Wash Solution gesetzt und für 12 Minuten inkubiert. Schließlich wurde die Testeinheit in ein Tube mit 650 μL Development Solution überführt, welche das chromogene AP-Substrat enthielt. Abhängig von der Raumtemperatur wurde das Ergebnis nach 15, 20 oder 30 Minuten abgelesen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Inkubationszeiten des Teststreifens im OncoE6™ Cervical Test in Abhängigkeit der Raumtemperatur

Raumtemperatur (°C)	15 - 16,9	17 - 22,9	23 - 28
Inkubationszeit	30 min	20 min	15 min

Testinterpretation des OncoE6™ Cervical Tests

Ein Testlauf wurde als valide gewertet, wenn eine violette Kontroll-Linie an der Ablesestelle C sichtbar war. Violette Linien an der Ablesestelle von HPV 16 und HPV 18 zeigen einen erfolgreichen Nachweis der jeweiligen E6 Onkoproteine an (Abbildung 13 A). Der Farbton der Linien, die sich nach der Durchführung des Tests zeigen, wurde mit einer Skala verglichen (Abbildung 13 B). Von der Herstellerfirma werden fünf Violetttöne unterschieden. Für die folgenden Analysen wurde ein Ergebnis zunächst als „positiv“ gewertet, sofern eine Linie unabhängig von ihrer Intensität sichtbar war. In eine Subanalyse der Referral-Kohorte floss anschließend auch die Intensität der Linienfärbung ein.

MATERIAL UND METHODEN

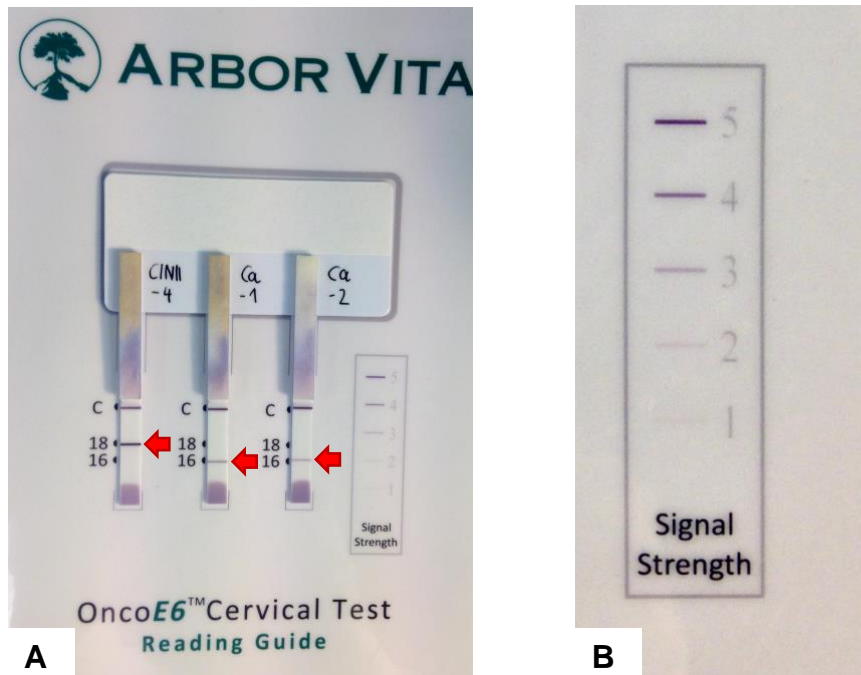


Abbildung 13 A: Beispiel für ein Testergebnis aus dem OncoE6™ Cervical Test dreier Patientinnen, Validität der Testung erkennbar an violetten Kontroll-Linien (C), positiver Nachweis des HPV-16-E6- bzw. HPV-18-E6-Proteins (mit roten Pfeilen markierte Linien an den Ablesestellen 16 und 18); B: Farbskala zur Auswertung der Linienintensität der Testeinheit

3.4.2 RECOMWELL HPV 16/18/45

Testprinzip des *recomWell* HPV 16/18/45

Der *recomWell* HPV 16/18/45 folgt dem Prinzip eines indirekten Sandwich-ELISAs. Auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Wells) sind monoklonale Kaninchen-Antikörper fixiert, die gegen das E7-Protein der HPV-Typen 16, 18 und 45 gerichtet sind. Zellen aus Zervixabstrichen werden lysiert, das Lysat wird in die Wells pipettiert, sodass sich die E7-Proteine der Probe an die monoklonalen Antikörper der Platte anlagern. Durch mehrere Waschschriffe werden nicht gebundene E7-Proteine entfernt. Anschließend zugegebene sekundäre Antikörper und Streptavidin-Konjugat bilden mit dem gebundenen E7-Protein einen Komplex. Dieser Komplex wird durch eine Peroxidase katalysierte Farbreaktion nachgewiesen. Die Intensität der Färbung kann mithilfe eines Photometers (Multiskan™FC, Thermofisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) gemessen werden und erlaubt eine Aussage über das Vorliegen der E7-Proteine der HPV-Typen 16 und/oder 18 und/oder 45.

Probenvorbereitung für den *recomWell* HPV 16/18/45

Die in ThinPrep®-Lösung vorliegenden Zervixabstriche wurden für zehn Sekunden auf hoher Stufe gevortext. Mit einer Saugkolben-Messpipette wurde die für den jeweiligen Ansatz erforderliche Menge abpipettiert und in ein Schraubverschlussröhrchen mit konischem Boden überführt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei $600 \times g$ wurde der Überstand dekantiert, verbliebener Überstand wurde mit einer Kolbenhubpipette entfernt. Das zurückbleibende Zellpellet wurde für fünf Sekunden gevortext, woran sich die Lyse anschloss. Die Menge der zugegebenen Lysepuffer unterschied sich in Abhängigkeit von den durchgeführten Experimenten und wird in den folgenden Abschnitten beschrieben. Das Zellpellet wurde mit Lysepuffer A versetzt und erneut fünf Sekunden gevortext. Daran schloss sich eine 30-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur an. Anschließend wurde Lysepuffer B hinzugegeben und das Lysat für fünf Sekunden gevortext. Einen schematischen Überblick über dieses Verfahren gibt Abbildung 14.

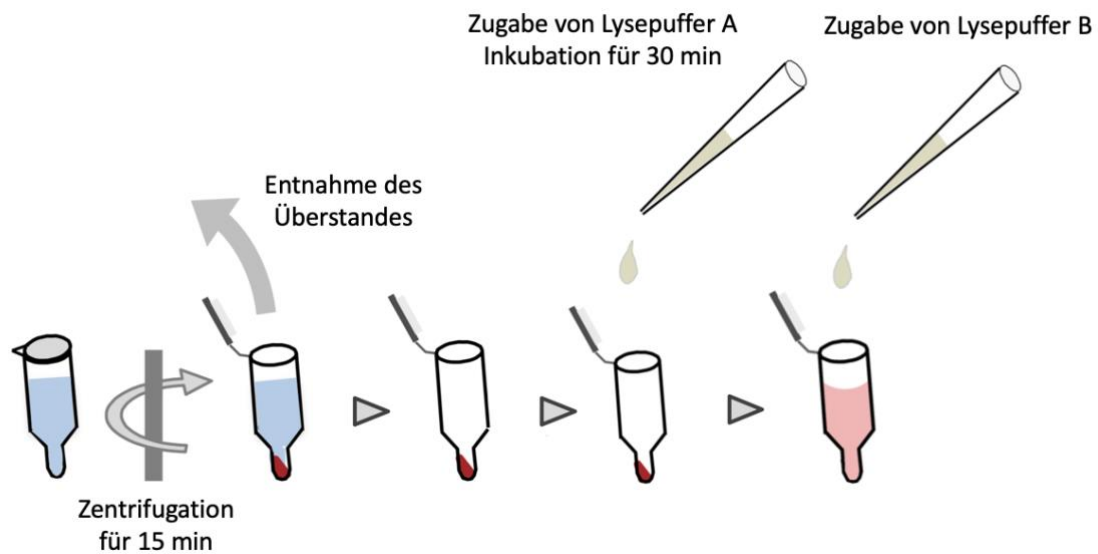


Abbildung 14: Probenvorbereitung für den recomWell HPV 16/18/45, modifiziert nach dem Benutzerhandbuch des OncoE6™ Cervical Tests der Arbor Vita Corporation, Arbor Vita Corporation, 2019

Gesonderte Probenvorbereitung für vorbereitende Messungen mit dem recomWell HPV 16/18/45

Die vorbereitenden Messungen untersuchten die Anwendbarkeit der Tests im Hinblick auf spezifische Fragestellungen. Daher wurden je nach Umstand spezielle Proben hergestellt, deren Vorbereitung von der Vorbereitung der Patientinnenproben der drei Kohorten abwich. Nachfolgend ist beschrieben, wie sich die Zusammenstellung und Verarbeitung von Proben für die vorbereitenden Messungen gestaltete. Vorexperimente wurden durchgeführt, um die benötigte und begrenzte Probenmenge zu vermindern (Scale-Down). Dafür wurden alle Reagenzien im gleichen Verhältnis reduziert. Des Weiteren wurde der Einfluss von ThinPrep®-Restlösung auf die Lyse und den Nachweis im ELISA ausgetestet (ThinPrep®-Rücklauf-Experimente)

Zellkulturproben

Zellkulturproben aus Scale-Down- und ThinPrep®-Rücklauf-Experimenten bestanden aus zwei Bestandteilen. Zum einen sorgte ein Hintergrund aus HPV-negativen Zervixabstrichen dafür, dass das nach Zentrifugation entstandene Zellpellet (rot in Abbildung 14) im Röhrchen stabil blieb. Zudem konnte durch Zugabe dieses Hintergrundes eine realistische Probenmatrix generiert werden. Zellkulturproben erhielten dadurch neben den Zervixepithelzellen eine Beimengung von Blut und Zervixschleim, welche sich auch in echten Zervixabstrichen finden. Diese Zervixabstriche stammten aus der diagnostischen Laborroutine des Labors für Gynäkologische Tumorimmunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Der negative HPV-Status dieser Proben war mittels Multiplexed Genotyping nachgewiesen worden. Zum anderen wurden dem Hintergrund eine definierte Zahl von Zellen der Karzinomzelllinien CaSki, HeLa, MS751 oder Cerv beigemischt, die in Zellkultur gezüchtet wurden.

Scale-Down-Experimente

Da zwei Onkoproteintests am gleichen Probenkollektiv durchgeführt werden sollten, stand für den einzelnen Test nur ein begrenztes Probenvolumen zur Verfügung. Für die Testung des OncoE6™ Cervical Tests ist ein Probenvolumen von 2 mL ausreichend. Für Versuche mit dem *recomWell* HPV 16/18/45 sind laut Gebrauchsanweisung zwar 15 mL Abstrichmaterial vorgesehen (Mikrogen Diagnostik GmbH, 2017). Sollte weniger Material verfügbar sein, sei allerdings auch eine Testung mit einer geringeren Menge möglich, sofern die Lysemenge an die verringerte Probenmenge angepasst werde.

Um zu testen, ob eine geringere Menge an Abstrichmaterial im *recomWell* HPV 16/18/45 eingesetzt werden kann, wurde ein Scale-Down-Experiment durchgeführt. Für diesen experimentellen Ansatz kamen sowohl Zellen aus Zellkultur als auch Patientinnenproben zum Einsatz.

MATERIAL UND METHODEN

Pro Zelllinie wurden durch Vermischung von kultivierten Zellen aus Karzinomzelllinien mit HPV-negativen ThinPrep®-Abstrichen zwei Vorratslösungen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Von diesen Vorratslösungen wurden nach dem Prinzip des 1 zu 5 Scale-Downs jeweils 2 mL und 400 µl abgenommen und lysiert. Dabei wurden Ansätze, die 2 mL der Vorratslösung beinhalteten, in 500 µl Lysepuffer A + 500 µl Lysepuffer B lysiert. Ansätze, die 400 µl der Vorratslösung enthielten, wurden in 100 µl Lysepuffer A + 100 µl Lysepuffer B lysiert. Es entstand so ein Paar aus Originalansatz und Scale-Down-Ansatz, bei dem beide Ansätze die gleiche Zellkonzentration aufwiesen. Wurde die gleiche Lysatmenge aus jedem dieser Ansätze entnommen und auf die ELISA-Platte gegeben, so wurden in Originalansatz und Scale-Down-Ansatz die gleiche Menge an Zellen getestet. Welche Zellzahlen im Well eingesetzt wurden, zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Eingesetzte Zellzahlen in Scale-Down-Experimenten mit dem recomWell HPV 16/18/45 mit Zellen aus Zellkultur¹

Zelllinie	Eingesetzte Zellzahlen			
HeLa	1.000 Zellen	2.500 Zellen	3.000 Zellen	9.000 Zellen
CaSki	3.000 Zellen	9.000 Zellen	25.000 Zellen	50.000 Zellen
MS751	3.000 Zellen	9.000 Zellen	25.000 Zellen	50.000 Zellen
Cerv	25.000 Zellen	50.000 Zellen		

Aufgrund der Tatsache, dass in realen Zervixabstrichen nicht alle Zellen HPV-positiv sind, wurde bei Patientinnenproben ein geringerer Scale-Down als bei Zelllinien gewählt. Der Scale-Down mit Patientinnenproben folgte daher dem Prinzip des 1 zu 3 Scale-Downs. In einem ersten Ansatz wurden 9 mL des Abstrichmaterials entnommen und in 300 µL Lysepuffer A + 300 µL Lysepuffer B lysiert. In einem zweiten Ansatz wurden von dem gleichen Zervixabstrich 3 mL des Abstrichmaterials entnommen und in 100 µL Lysepuffer A + 100 µL Lysepuffer B lysiert. Beide Ansätze wurden für jede Patientin einzeln verglichen.

¹ Einsatz unterschiedlicher Zellzahlen pro Zelllinie aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität des Assays für verschiedene E7-Proteine

ThinPrep®-Rücklauf-Experimente

Im Zuge der Abarbeitung des Tests kann es vorkommen, dass Zellen nach der Zentrifugation nicht ausreichend von ThinPrep® befreit werden, sodass ein Rest des Lagerungsmediums zurückbleibt. Dieses Phänomen kann das Testergebnis verfälschen. Um zu evaluieren, ob das verbleibende ThinPrep® die nachfolgende Lysereaktion und den Ausgang des ELISA-Tests beeinträchtigt, wurden den Zellen nach Zentrifugation definierte Mengen ThinPrep® hinzugegeben. Die Extinktion der so veränderten Proben wurde mit der Extinktion einer Probe verglichen, der kein zusätzliches Medium hinzugegeben worden war.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, wurden pro Zelllinie fünf Proben hergestellt. Jede Probe bestand aus einem Milliliter HPV-negativen ThinPrep® Abstrichmaterials aus der diagnostischen Laborroutine, das mit Karzinomzellen aus Zellkultur (CaSki, HeLa, Cerv) versetzt wurde. Nach Zentrifugation wurden vier Proben definierte Mengen des Lagerungsmediums ThinPrep® zugegeben. Der verbleibenden fünften Probe wurde kein zusätzliches ThinPrep® hinzugegeben. Da dies den idealen Zustand der Abarbeitung einer Probe darstellt, wurde diese Probe als „Idealprobe“ bezeichnet. Anschließend wurden alle fünf Proben in 450 µl Lysepuffer A + 450 µl Lysepuffer B lysiert. Die zusätzlichen ThinPrep®-Mengen waren am zugegebenen Lysevolumen orientiert und betragen 10 %, 20 %, 30 % und 50 % (zugegebene ThinPrep®-Mengen: 90 µL, 180 µL, 270 µL und 450 µL). Um zu vermeiden, dass die Probe durch das zusätzliche Medium verdünnt wurde, waren die Zellzahlen vor Zentrifugation erhöht worden. Die Endkonzentration von Zellen war damit in allen Proben gleich.

Der Einfluss zurückbleibenden ThinPreps® auf die Lysereaktion wurde auch in einem Scale-Down-Ansatz untersucht. Die Zahl der Karzinomzellen betrug in diesen Experimenten 1/3 der Zellzahl, die im Originalansatz eingesetzt wurde. Diese Zellen wurden in 150 µl Lysepuffer A + 150 µl Lysepuffer B lysiert. Zusätzliche ThinPrep®-Mengen betragen 30 µl, 60 µl, 90 µl sowie 150 µl. Pro Well wurden 25.000 Zellen der Zelllinien CaSki und Cerv eingesetzt. Für die Zelllinie HeLa betrug die Zellzahl pro Well 2.500 Zellen.

MATERIAL UND METHODEN

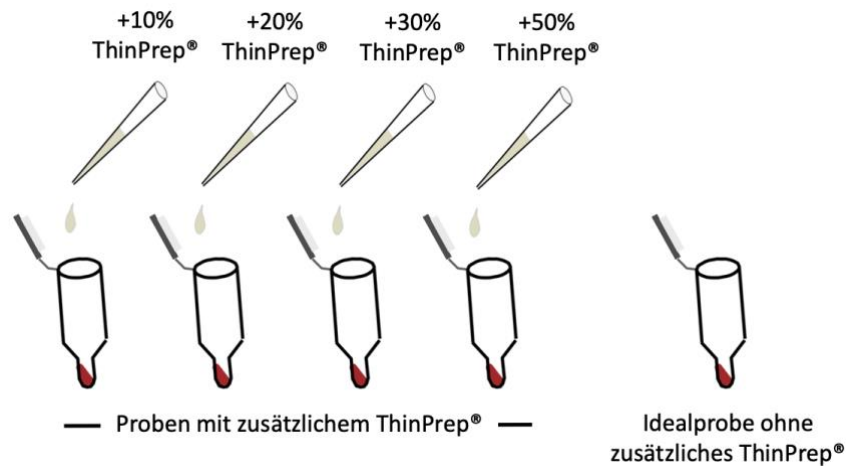


Abbildung 15: Vorbereitung der Proben für die ThinPrep®-Rücklauf-Experimente, modifiziert nach dem Benutzerhandbuch des OncoE6™ Cervical Tests der Arbor Vita Corporation, Arbor Vita Corporation, 2019

Washer-Validierung

Um festzustellen, ob sich die Ergebnisse einer Abarbeitung mit einem ELISA-Washergerät von denen der händischen Waschung unterscheiden, wurde wie folgt vorgegangen: Zwei recomWell HPV 16/18/45 Platten wurden mit identischen Lysaten bestückt. Eine der Platten wurde durch Zugabe des Waschpuffers mit der Kolbenhubpipette händisch gewaschen. Bei der anderen Platte erfolgten die Waschschriffe maschinell unter Einsatz des ELISA-Washergeräts (Mikroplate Washer 405™LS, Winooksi, VT, USA). Für die Washer-Validierung wurden Zellen aus Zellkultur und Patientinnenproben verwendet. Für händische und maschinelle Waschung wurde Waschpuffer aus demselben Ansatz verwendet.

MATERIAL UND METHODEN

Für den Vergleich von Zellen aus Zellkultur wurden 1.000.000 Zellen pro Zelllinie lysiert und die Lysate weiter verdünnt. Die Zellzahlen wurden dabei stets von einem Verdünnungsschritt zum nächsten halbiert. Die Zellzahlen für CaSki und MS751 betragen 100.000, 50.000, 25.000, 12.500 und 6.250 Zellen. In der Testung von HeLa-Zellen wurden die Halbierungsschritte einmalig unterbrochen. So wurde anstatt die vorherige Zellzahl von 2.500 zu halbieren im nächsten Schritt eine Zellzahl von 1.000 Zellen eingesetzt. So war es möglich am Ende der Verdünnungsreihe eine Mindestmenge von 500 Zellen zu testen. Auf der Platte eingesetzte Zellzahlen betragen damit für HeLa-Zellen 10.000, 5.000, 2.500, 1.000 und 500 Zellen. Durch diese Verdünnungsschritte war es möglich, den Einfluss der maschinellen Waschung bei verschiedenen Zellmengen abzuschätzen. Für den Washer-Vergleich mit Patientinnenproben wurden 3 mL des Abstrichmaterials entnommen und in 100 µL Lysepuffer A + 100 µL Lysepuffer B lysiert. Von diesen Lysaten wurden jeweils 100 µL abgenommen und auf eine der beiden Platten gegeben. Nachdem die Zelllysate auf die Platten aufgebracht waren, lief die weitere Abarbeitung wie unter „Austestung“ beschrieben ab.

Proben aus Pilot-, Screening- und Referral-Kohorte

Die Ergebnisse des Scale-Down-Experiments hatten nahegelegt, dass die Testergebnisse des *recomWell* HPV 16/18/45 bei ursprünglich vorgesehener Probenmenge und reduzierter Probenmenge vergleichbar waren. Daher wurde in nachfolgenden Messungen statt der vom Hersteller vorgegebenen Menge von 15 mL generell 3 mL Probenmaterial eingesetzt. Von den ausgewählten ThinPrep®-Proben wurden je 3 mL Abstrichmaterial entnommen, für 15 Minuten auf 600 × g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µL Lysepuffer A versetzt. Die Mischung wurde für fünf Sekunden gevortext, sie inkubierte sodann für 30 Minuten auf Raumtemperatur. Schließlich wurden 100 µL Lysepuffer B hinzugegeben und die Probe noch einmal für fünf Sekunden gevortext. Die weitere Abarbeitung der Proben verlief wie folgt beschrieben. Aus Ergebnissen vorheriger Experimente konnte eine Verfälschung der Messung durch maschinelle Waschung ausgeschlossen werden (4.1.3). Daher wurde ein ELISA-Washer für die Waschschrte in der Testung dieser Kohorten verwendet.

Austestung des *recomWell* HPV 16/18/45

Nach der Probenvorbereitung durchliefen die Lysate die nachfolgend beschriebenen Schritte, die in der Gebrauchsanweisung des Tests vorgegeben waren (Mikrogen Diagnostik GmbH, 2017). Je 100 μL des Lysats wurden in die Wells der ELISA-Platte (Mikrogen Artikel-Nr. 7904) pipettiert. Außerdem wurden bei jedem Testansatz je 100 μL eines Blindwerts (Blank) sowie je eine Lösung zur Positivkontrolle und zur Negativkontrolle mitgeführt. Der Blank wurde durch 1 + 1 Mischung aus Lysepuffer A und Lysepuffer B hergestellt. Positiv- und Negativkontrolle entstammen dem Kit des Herstellers. Die Platte wurde mit Abdeckfolie abgeklebt und inkubiert für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Platte zügig ausgekippt und kräftig auf Papiertüchern abgeklopft. Die Platte wurde dann gewaschen, indem die Kavitäten mit 300 μL Waschpuffer befüllt und gleich darauf geleert wurden. Dieser Waschschrift wurde dreimal durchgeführt. Der eingesetzte Waschpuffer bestand aus einer 1 + 9 Mischung aus Waschpufferkonzentrat und deionisiertem Wasser. Anschließend wurden 100 μL Sekundär-Anti HPV E7 Antikörper in jedes Well gegeben. Die Platte wurde abgeklebt, inkubiert eine Stunde bei Raumtemperatur und wurde erneut dreimal gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100 μL Streptavidin-Konjugat pro Well. Nachdem die Platte abgeklebt war und eine Stunde inkubiert hatte, wurde sie sechsmal gewaschen. Abschließend wurden 100 μL Substrat in jedes Well gegeben. Die Platte wurde vor Licht geschützt und inkubiert unter Lichtausschluss für 30 Minuten. Daraufhin wurde die Substratreaktion durch Zugabe von 100 μL /Well der im Kit enthaltenen Stopplösung abgestoppt. In einem Photometer wurden die Extinktionen der einzelnen Kavitäten bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Testinterpretation des *recomWell* HPV 16/18/45

Von den Extinktionswerten der Kontrollen und der Proben wurde der Extinktionswert des Blanks abgezogen ($E_{\text{Kontrolle/Probe}} - E_{\text{Blank}}$).

Laut Herstellerfirma war der Test unter folgenden Bedingungen auswertbar:

A) Extinktion des Blanks $\leq 0,5500 \text{ OD}_{450}$

B) Extinktion der Negativkontrolle nach Blank-Korrektur $\leq 0,0760 \text{ OD}_{450}$

$$(E_{\text{Negativkontrolle}} - E_{\text{Blank}} \leq 0,0760 \text{ OD}_{450})$$

C) Extinktion der Positivkontrolle nach Blank-Korrektur $> 0,3000 \text{ OD}_{450}$

$$(E_{\text{Positivkontrolle}} - E_{\text{Blank}} > 0,3000 \text{ OD}_{450})$$

War die Extinktion einer Probe nach Blank-Abzug größer oder gleich des Cutoffs von $0,0760 \text{ OD}_{450}$, so wurde das Ergebnis als „positiv“ gewertet.

3.5 VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN

Für die Ergebnisse dieser Arbeit wurden die allgemein laborüblichen Geräte und Materialien eingesetzt. Die nachfolgenden Tabellen 3-5 zeigen eine Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte und Reagenzien.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial und Geräte für die Testung des *recomWell* HPV 16/18/45

Verbrauchsmaterial	Name	Hersteller
Tubes		
	2 mL Tubes	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	Falcon® 15 mL aus Polystyren	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
	Falcon® 50 mL aus Polystyren	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
Pipettiermaterial		
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips 0,5-20 µL; 2-100 µL; 100-1000 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikropipetten	Research 0,5-10 µL; 10-100 µL; 100-1000 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mehrkanal-Mikropipetten	Research 0,5-10 µL; 30-300 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Serologische Pipetten	Falcon® 2 mL; 5 mL; 10 mL; 25 mL	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
Pipettierhelfer	Powerpette plus	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Geräte		
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc. (Bohemia, NY, USA)
Zentrifuge	Heraeus™ Biofuge primo R	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Mikrotiterplattenwasher	Mikroplate Washer 405™ LS	BioTek Instruments Inc. (Winooksi, VT, USA)
Werkbank	HerraSafe™ KS 12	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Photometer	Multiskan™ FC	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Kühl- und Eisschränke		
Kühlschrank	Liebherr Premium	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Eisschrank	Sanyo VIP Series Ultra Low Temperature Freezer	Sanyo Electric Co. Ltd. (Moriguchi, Japan)

Tabelle 4: Reagenzien und mitgelieferte Materialien der *recomWell HPV 16/18/45* Testung in der Reihenfolge ihrer Verwendung

Material	Hersteller
Mikrotiterplatte	Mikrogen Diagnostik GmbH (Neuried, Deutschland)
Lysepuffer A	Mikrogen Diagnostik GmbH
Lysepuffer B	Mikrogen Diagnostik GmbH
Waschpuffer Konzentrat	Mikrogen Diagnostik GmbH
Ribonuklease-freies Wasser Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Positivkontrolle	Mikrogen Diagnostik GmbH
Negativkontrolle	Mikrogen Diagnostik GmbH
Sekundärantikörper	Mikrogen Diagnostik GmbH
Streptavidinkonjugat	Mikrogen Diagnostik GmbH
Substratlösung	Mikrogen Diagnostik GmbH
Stopplösung	Mikrogen Diagnostik GmbH

Tabelle 5: Reagenzien und mitgelieferte Materialien der Testung mit dem *OncoE6™ Cervical Test* Testung in der Reihenfolge ihrer Verwendung

Material	Hersteller
Specimen Rinse Solution	Arbor Vita Corporation (Fremont, CA, USA)
Lysis Solution A	Arbor Vita Corporation
Lysis Solution B	Arbor Vita Corporation
Testunit	Arbor Vita Corporation
Wash Solution D	Arbor Vita Corporation
Developing Solution E	Arbor Vita Corporation

Zur statistischen Analyse der vorliegenden Arbeit wurden die Programme SPSS Statistics Version 25 für Mac (IBM, Armonk, NY, USA) und Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) verwendet. Alle Analysen waren explorativ und nicht für multiples Testen adjustiert.

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

Um zu testen, ob sich die Extinktionen bei empfohlener Probenmenge (Originalansatz) und reduzierter Probenmenge (Scale-Down-Ansatz) unterscheiden, wurden die zentralen Tendenzen beider Gruppen verglichen. Ebenso wurden die Extinktionen von Proben, die manuell abgearbeitet wurden, mit solchen verglichen, die im ELISA-Washer eingesetzt worden waren. Da für die Berechnung keine Normalverteilung der Extinktion gegeben sein muss, war der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test hierfür geeignet. Als Nullhypothese galt dabei, dass es keinen Unterschied zwischen den Extinktionen beider Gruppen gibt. Diese wurde verworfen, sofern der p-Wert unter 0,05 lag.

Prozentuale Veränderung

Inwieweit zusätzliches ThinPrep®-Medium die Extinktion beeinflusst, wurde anhand prozentualer Veränderung zur Extinktion der Idealprobe beschrieben. Zunächst wurde die Differenz zwischen der Extinktion der Probe mit zusätzlichem ThinPrep® und der Extinktion der Idealprobe berechnet. Der sich daraus ergebende Wert wurde durch die Extinktion der Idealprobe geteilt und als Prozent dargestellt.

Deskriptive Statistik

Das Alter der Patientinnen und das Ergebnis der HPV-Testung wurden in absoluter und relativer Häufigkeit und Median mit oberem und unterem Quartil angegeben. Ebenso wurden die absolute und relative Häufigkeit für die Ergebnisse aus Zytologie und Kolposkopie (sofern vorhanden) angeführt.

Verteilung

Mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde überprüft, ob die Daten zum Alter der Patientinnen normalverteilt waren. Die Nullhypothese, dass eine Normalverteilung vorliegt, wurde ab einem p-Wert $< 0,05$ verworfen.

Sensitivität und Spezifität

Um die diagnostische Wertigkeit der Onkoproteintests beurteilen zu können, wurden Sensitivität und Spezifität für verschiedene Dysplasiegrade berechnet. Der Dysplasiegrad wurde aus dem Bericht der beurteilenden Pathologen übernommen und als Goldstandard der Diagnostik definiert.

Die Sensitivität und Spezifität wurden dabei zunächst für jeden der Dysplasiegrade einzeln bestimmt. Danach wurden jeweils niedriggradige und höhergradige Dysplasien getrennt und eine kumulative Sensitivität und Spezifität berechnet. Zum einen wurden dabei Patientinnen ohne Dysplasie und Patientinnen mit CIN1 als „<CIN2“ zusammengefasst. Patientinnen mit Dysplasien vom Grad CIN2, CIN3 sowie Patientinnen mit Karzinom wurden als „CIN2+“ gruppiert. In einer zweiten Berechnung wurden Patientinnen ohne Dysplasie, Patientinnen mit CIN1 und CIN2 als „<CIN3“ eingeordnet. Patientinnen mit CIN3 und solche mit Karzinom wurden als „CIN3+“ bezeichnet. Diese getrennten Berechnungen bieten sich an, da Dysplasien vom Grad CIN1 ein hohes Potential zur Spontanregression aufweisen. Dysplasien vom Grad CIN2 oder CIN3 hingegen entwickeln sich wesentlich häufiger zum invasiven Karzinom (Khan et al., 2005a).

MATERIAL UND METHODEN

Der Berechnung der Sensitivität und Spezifität lagen damit folgende Formeln zugrunde:

A	Sensitivität = $\frac{\text{richtig positiv}}{\text{positiv und Dysplasiegrad}}$
	Spezifität = $\frac{\text{richtig negativ}}{\text{keine Dysplasie}}$
B	Sensitivität = $\frac{\text{richtig positiv}}{\text{CIN2+}}$ bzw. $\frac{\text{richtig positiv}}{\text{CIN3+}}$
	Spezifität = $\frac{\text{richtig negativ}}{<\text{CIN2}}$ bzw. $\frac{\text{richtig negativ}}{<\text{CIN3}}$

Formel 1: Formeln zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität der Onkoproteintests, A: Sensitivität und Spezifität für einzelne Dysplasiegrade, B: Sensitivität und Spezifität für zusammengefasste Dysplasiegrade

Zusammenhang der Linienintensität des OncoE6™ Cervical Tests und der Extinktion des *recomWell* HPV 16/18/45 mit dem Dysplasiegrad

Wie der Dysplasiegrad einer Probe und Intensität der Ergebnislinie des OncoE6™ Cervical Tests in Verbindung stehen, wurde anhand einer Korrelationsberechnung untersucht. Ebenso wurde die Stärke der Extinktion des *recomWell* HPV 16/18/45 mit dem der Probe zugrundeliegenden Dysplasiegrad korreliert. Unter Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests zeigte sich, dass die Dysplasiegrade nicht normalverteilt waren ($p < 0,001$). Dies legte eine Korrelationsberechnung nach Spearman nahe. Der ausgegebene Rangkorrelationskoeffizient r_s zeigt die Stärke der Korrelation an. Je näher r_s an 1 liegt, desto stärker ist die positive Korrelation. Eine negative Korrelation ist umso stärker, je näher sie an -1 liegt. Ein r_s von 0 zeigt einen fehlenden Zusammenhang an.

Zusammenhang der Ergebnisse aus *recomWell* HPV 16/18/45 und dem OncoE6™ Cervical Test

Um den Zusammenhang zwischen dem Ergebnis des *recomWell* HPV 16/18/45 und dem OncoE6™ Cervical Test zu beurteilen, wurden zwei verschiedene Tests verwendet.

Zunächst wurde lediglich berücksichtigt, ob die Tests ein positives oder negatives Ergebnis zeigen. Da damit eine Variable untersucht wird, die nur zwei einander ausschließende Ausprägungen haben kann (positiv, negativ), wurde der Phi-Kontingenzkoeffizient berechnet. Dieser Koeffizient kann Werte von -1 bis 1 annehmen. Je näher der Wert an -1 oder 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang zwischen den beiden Variablen.

Anschließend wurde die Extinktion der Probe im *recomWell* HPV 16/18/45 mit der Stärke der Ergebnislinie im OncoE6™ Cervical Test verglichen. Die fehlende Normalverteilung war bereits anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests bekannt ($p < 0,001$). Es bot sich daher an, auf den bereits beschriebenen Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman zurückzugreifen.

4 ERGEBNISSE

Das folgende Kapitel ist in zwei Teile gegliedert. Zunächst werden die Ergebnisse aus drei vorbereitenden Experimenten mit dem *recomWell* HPV 16/18/45 erläutert. In diesen Experimenten wurde untersucht, ob es möglich ist, die Testabarbeitung des Standardprotokolls der Firmen zu modifizieren.

Der zweite Teil dieses Kapitels beinhaltet die Ergebnisse aus der Testung von drei Patientinnenkohorten. In diesen Messungen wurde der *recomWell* HPV 16/18/45 mit den zuvor evaluierten Modifikationen sowie der OncoE6 Cervical Test™ angewendet.

4.1 VORBEREITENDE EXPERIMENTE MIT DEM *RECOMWELL* HPV 16/18/45

4.1.1 REDUKTION DES PROBENVOLUMENS

Der *recomWell* HPV 16/18/45 verlangt in seiner Abarbeitung nach Standardprotokoll den Einsatz von 15 mL Abstrichmaterial (Mikrogen Diagnostik GmbH, 2017). Für die vorliegenden Experimente an Patientinnenkohorten wurden Zellen abgestrichen und in 20 mL Fixationsmedium ausgewaschen. Davon gingen zwischen drei und fünf Milliliter in die zytologische Untersuchung und HPV-Genotypisierung ein. Der wissenschaftliche Mehrwert der vorliegenden Arbeit besteht unter anderem darin, dass verschiedene Tests am gleichen Probenmaterial durchgeführt wurden. Ein Teil des nach Zytologie und HPV-Genotypisierung verbleibenden Abstrichmaterials wurde dem OncoE6™ Cervical Test zugeführt. Somit konnte nicht die vorgeschriebene Probenmenge von 15 mL in die Testung mit dem *recomWell* HPV 16/18/45 eingehen. Um diesem Problem zu begegnen, kam ein Scale-Down zum Einsatz. Dazu wurde das Probenvolumen um denselben Faktor reduziert wie das Lysevolumen. Die Konzentration der Zellen im Scale-Down-Lysat gleicht damit der Zellkonzentration in einem Lysat mit der originalen Menge an Lyse-reagenz. Um zu prüfen, ob ein Scale-Down in dieser Form möglich ist, wurden Probenpaare aus einem Originalansatz (vorgeschriebene Proben- und Lysemenge) und einem Scale-Down-Ansatz (reduzierte Proben- und Lysemenge) hergestellt.

ERGEBNISSE

Mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurden die Extinktionen von 20 Probenpaaren aus dem Originalansatz und dem Scale-Down-Ansatz verglichen. Dabei wurden zunächst Zelllinien in hoher Zellzahl (jeweils 25.000 und 50.000 Zellen/Well für CaSki, Cerv und MS75; jeweils 1.000 und 2.500 Zellen/Well für HeLa) eingesetzt. Es zeigte sich dabei kein relevanter Unterschied innerhalb dieser gepaarten Proben ($p = 0,144$). Die Extinktionen der Proben im Originalansatz betragen dabei durchschnittlich $0,4184 \text{ OD}_{450}$, im Scale-Down-Ansatz waren es im Durchschnitt $0,3014 \text{ OD}_{450}$.

Im nächsten Schritt wurden die Zelllinien in niedrigerer Zellzahl (3.000 und 9.000 Zellen/Well für CaSki, MS751 und HeLa) eingesetzt. Dabei wurden 18 gepaarte Proben aus Originalansatz und Scale-Down im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichen. Innerhalb dieser gepaarten Proben war kein relevanter Unterschied festzustellen ($p = 0,107$). Im Durchschnitt lagen Extinktionen aus dem Originalansatz bei $0,7597 \text{ OD}_{450}$, im Scale-Down-Ansatz bei $0,6575 \text{ OD}_{450}$.

Wurden Patientinnenproben in 14 gepaarten Proben aus Originalansatz und Scale-Down-Ansatz verglichen, so zeigte sich im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test kein bedeutender Unterschied ($p = 0,975$). Die Extinktionen im Originalansatz betragen im Mittel $0,2537 \text{ OD}_{450}$, im Scale-Down-Ansatz $0,2465 \text{ OD}_{450}$.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Nullhypothese angenommen, dass zwischen den Extinktionen von Originalansatz und Scale-Down kein Unterschied besteht. Dies erlaubte es, in nachfolgenden Experimenten den *recomWell* HPV 16/18/45 mit reduziertem Probenvolumen durchzuführen.

4.1.2 EVALUATION DES EINFLUSSES ZURÜCKBLEIBENDEN THINPREP®S

Bevor eine Zellprobe lysiert und das gegebenenfalls enthaltene Onkoprotein zugänglich gemacht wird, müssen die Zellen von ihrem Lagerungsmedium (ThinPrep®) befreit werden. Das Protokoll des *recomWell* HPV 16/18/45 gibt vor, die Zellprobe zu zentrifugieren, um die Zellen zu konzentrieren und ThinPrep® abzutrennen. Anschließend soll das überständige Medium so gut wie möglich entfernt werden (Mikrogen Diagnostik GmbH, 2017). Es konnte in der Abarbeitung des Tests allerdings vorkommen, dass geringe ThinPrep®-Mengen nicht vollständig entfernt werden konnten. Dieses verbleibende Medium könnte den nachfolgenden Lyseprozess oder die ELISA-Methode beeinträchtigen. Um diese Hypothese zu testen, wurden Zellproben mit definierter Zellzahl hergestellt. Diese Zellen wurden nach Zentrifugation von ihrem Medium getrennt und anschließend mit definierten Mengen an ThinPrep®-Medium versetzt. Die Extinktion der Proben mit zusätzlichem ThinPrep® wurden mit der Extinktion einer Probe ohne zusätzliches Medium (Idealprobe) verglichen. Diese Gegenüberstellung wurde für Zellen aus jeder der drei Zellreihen CaSki, HeLa und Cerv gesondert durchgeführt. Dadurch wurde die Hypothese für die E7 Antigene der HPV-Typen untersucht, die der *recomWell* HPV 16/18/45 erkennt. Proben, die zusätzliches ThinPrep® beinhalteten, wurden anteilmäßig mehr HPV-positive Zellen zugesetzt. So konnte vermieden werden, dass es zu einem Verdünnungseffekt kommt, der einen eventuell gestörten Lyseprozess überlagert.

Es zeigte sich, dass sich die Extinktionen von Proben, denen zusätzliches ThinPrep® zugegeben worden war, zwar stark von der Idealprobe unterschieden (Varianz 0,0002-0,0172 OD₄₅₀). Hinsichtlich des Cutoffs zeigten jedoch – mit Ausnahme einer von 30 Proben – alle veränderten Proben das gleiche Resultat wie die Idealprobe (positiv – negativ). Diese Ausnahme betraf die Probe, in der 25.000 Zellen Cerv eingesetzt worden waren. Bei Zugabe von 30 % ThinPrep® fiel deren Extinktion mit 0,0700 OD₄₅₀ knapp unter den Cutoff (0,0760 OD₄₅₀). Alle anderen Proben dieser Zelllinie (Zugabe von 0 %, 10 %, 20 %, 50 % des Endlysevolumens) zeigten eine Extinktion oberhalb des Cutoffs.

ERGEBNISSE

Den geringsten Unterschied im Vergleich zur Idealprobe zeigten Proben, denen die geringste Menge zusätzlichen ThinPreps® zugegeben wurde (Abbildung 16). Wurden 10 % des Endlysevolumens hinzugegeben, nahm die Extinktion der Probe im Mittel um 0,2 % im Vergleich zur Idealprobe zu. Der Unterschied zur Idealprobe war am größten, wenn 50 % hinzugegeben wurden: Im Mittel nahmen die Werte um 26,0 % ab. Der Einfluss zurückbleibenden ThinPreps® auf die Lysereaktion war in einem Scale-Down-Ansatz ähnlich den Werten, die im Originalansatz beobachtet wurden.

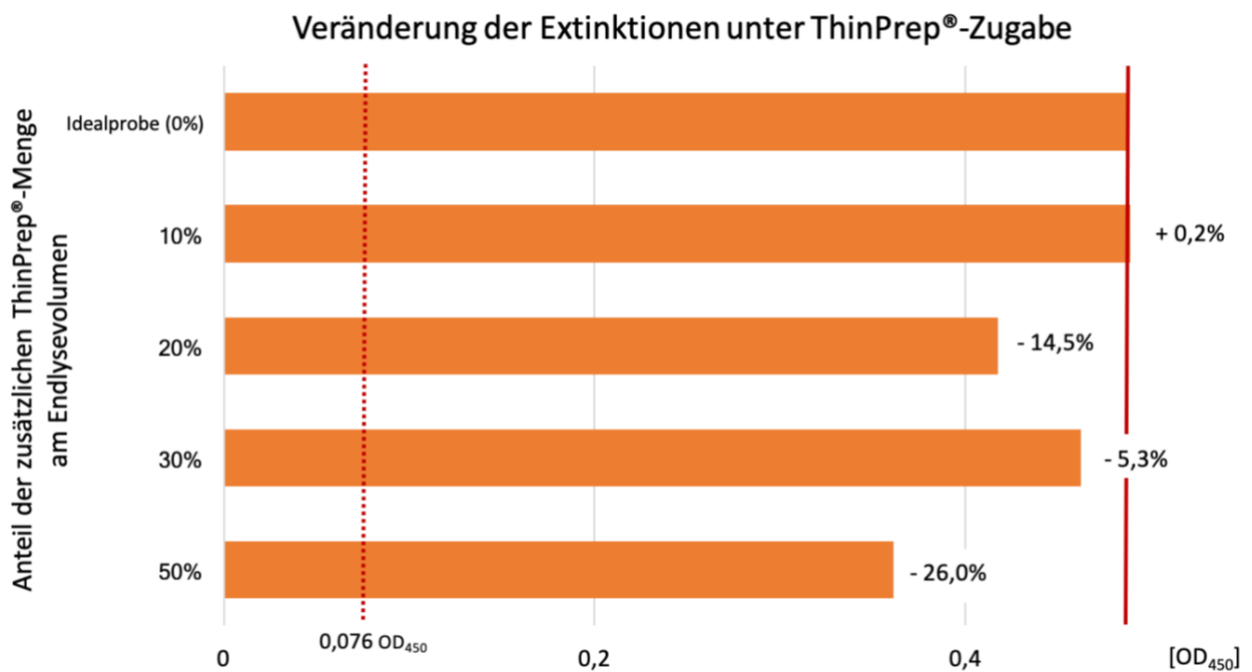


Abbildung 16: Darstellung der Veränderung der durchschnittlichen Extinktionen bei Zugabe verschiedener Mengen an ThinPrep®, angegeben in Prozent im Vergleich zur Idealprobe, gepunktete Linie: Cut-off für Testpositivität; Durchschnitt der Extinktionen für alle Zelllinien, bei jeweils Zugabe von 0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 % ThinPrep® des Endlysevolumens

ERGEBNISSE

4.1.3 VALIDIERUNG DES WASHERGERÄTS

Um zu ermitteln, ob der Waschvorgang von einem ELISA-Washergerät übernommen werden kann, wurden die Extinktionen identischer Proben nach manueller und maschineller Abarbeitung verglichen. Beim Vergleich von Zellen aus Zellkultur, zeigte sich im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, dass ihre Extinktionen bei maschineller Abarbeitung (Mittelwert: 0,7579 OD₄₅₀) geringer waren als bei manueller Abarbeitung (Mittelwert: 0,8805 OD₄₅₀; $p = 0,001$).

Die Extinktion von Patientinnenproben waren im Vergleich maschineller (Mittelwert 0,8704 OD₄₅₀) gegenüber manueller Abarbeitung (Mittelwert: 0,9185 OD₄₅₀) im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test geringfügig niedriger, aber nicht relevant unterschiedlich ($p = 0,093$).

Die Nullhypothese besagte, dass die Extinktionen der Proben, die manuell gewaschen werden, gleich derer sind, die mit dem ELISA-Washer gewaschen werden. Sie konnte daher nur für die Messung von Patientinnenproben angenommen werden. Dass der ELISA-Washer in nachfolgenden Experimenten für die Waschung von Patientinnenproben eingesetzt werden kann, gilt anhand der vorliegenden Ergebnisse als bestätigt.

4.2 ERGEBNISSE DER MESSUNG VERSCHIEDENER PATIENTINNENKOHORTEN

4.2.1 ERGEBNISSE AUS DER PILOT-KOHORTE

Die Charakteristika der Pilot-Kohorte sind untenstehend in der Tabelle 6 zusammengefasst.

ERGEBNISSE

Tabelle 6: Beschreibung der Studienpopulation der Pilotkohorte nach histologischen Gruppen und gesamt

n (%) ¹	Dysplasiefrei		Dysplasiefrei HPV positiv		CIN1	CIN2	CIN3	Karzinom	Gesamt
	HPV negativ	HPV positiv	HPV negativ	HPV positiv					
Alter in Jahren ²	5 (12,8)	10 (25,6)	5 (12,8)	5 (12,8)	5 (12,8)	5 (12,8)	9 (23,1)	5 (12,8)	39 (100)
Alter in Jahren ²	37 [34;31]	37 [29;39]	31 [30;31]	30 [29;32]	35 [35;37]	36 [33;37]	35 [30;37]		35 [30;37]
HPV-Testung³									
Multiplexed Genotyping									
6+	0	1 (10)	1 (20)	0	1 (11,1)	0	1 (11,1)	0	3 (7,7)
16+	0	8 (80)	5 (100)	5 (100)	8 (88,9)	4 (80)	8 (88,9)	4 (80)	30 (76,9)
18+	0	3 (30)	2 (40)	1 (20)	1 (11,1)	1 (20)	1 (11,1)	1 (20)	8 (20,5)
31+	0	0	2 (40)	1 (20)	2 (22,2)	0	2 (22,2)	0	5 (12,8)
33+	0	2 (20)	1 (20)	0	1 (11,1)	0	1 (11,1)	0	4 (10,3)
35+	0	0	0	0	3 (33,3)	0	3 (33,3)	0	3 (7,7)
39+	0	0	0	0	1 (11,1)	0	1 (11,1)	0	1 (2,6)
42+	0	1 (10)	1 (20)	0	2 (22,2)	0	2 (22,2)	0	4 (10,3)
45+	0	1 (10)	0	1 (20)	0	1 (20)	0	0	2 (5,1)
51+	0	2 (20)	0	2 (40)	0	2 (40)	0	0	4 (10,4)
52+	0	2 (20)	2 (40)	1 (20)	1 (11,1)	0	1 (11,1)	0	6 (15,4)
53+	0	0	1 (20)	0	1 (11,1)	0	1 (11,1)	0	2 (5,1)
54+	0	1 (10)	1 (20)	0	2 (22,2)	0	2 (22,2)	0	4 (10,3)
56+	0	1 (10)	2 (40)	0	0	0	0	0	3 (7,7)
59+	0	2 (20)	1 (20)	1 (20)	2 (22,2)	1 (20)	2 (22,2)	1 (20)	7 (17,9)
66+	0	2 (20)	1 (20)	1 (20)	1 (11,1)	1 (20)	1 (11,1)	0	5 (12,8)
68+	0	0	1 (20)	0	0	0	0	0	1 (2,6)
70+	0	0	1 (20)	0	0	0	0	1 (20)	2 (5,1)
73+	0	0	0	1 (20)	0	1 (20)	0	0	1 (2,6)
82+	0	0	0	1 (20)	0	1 (20)	0	1 (20)	2 (5,1)
Zytologie⁴									
I, II-a	2 (40)	6 (60)	1 (25)	1 (25)	1 (11,1)	1 (25)	1 (11,1)	0	11 (32,4)
II-p, II-g	1 (20)	2 (20)	1 (25)	0	0	0	0	1 (50)	5 (14,7)
III-p, III-g, III-e	1 (20)	0	0	0	0	0	0	0	1 (2,9)
IIID1	0	2 (20)	2 (50)	1 (25)	1 (11,1)	0	1 (11,1)	0	6 (17,6)
IIID2, IV	1 (20)	0	0	2 (50)	7 (77,8)	0	7 (77,8)	0	10 (29,4)
V-p, V-g	0	0	0	0	0	0	0	1 (50)	1 (2,9)
keine Zytologie	0	0	1 (-)	1 (-)	0	1 (-)	0	3 (-)	5 (-)
Kolposkopie⁵									
normal	2 (66,7)	4 (40)	0	1 (33,3)	0	1 (33,3)	0	0	7 (23,3)
minor changes	1 (33,3)	6 (60)	2 (40)	1 (33,3)	0	1 (33,3)	0	0	10 (33,3)
major changes	0	0	3 (60)	1 (33,3)	7 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	13 (43,3)
N/A ⁶	2 (-)	0	0	2 (-)	2 (0)	3 (-)	2 (0)	3 (-)	9 (-)

¹ Angabe in n und prozentuellem Anteil an der Kohorte

² Angaben in Median mit [oberem und unteren Quartil]

³ Mehrfachinfektionen möglich

⁴ nach Münchner Nomenklatur III

⁵ nach Kolposkopischer Nomenklatur nach Rio 2011

⁶ nicht verfügbar

ERGEBNISSE

4.2.1.1 BESCHREIBUNG DER STUDIENPOPULATION DER PILOTKOHORTE

Die eingeschlossenen Patientinnen waren im Durchschnitt 35 Jahre alt. Die jüngste Patientin war 20 Jahre, die älteste 76 Jahre alt. Der Zeitraum zwischen Abstrich und Testung lag zwischen einem und neun Monaten. Im Mittel waren zwischen Abstrichnahme und Austestung der Probe 3,6 Monate vergangen.

Bei 34 (87,2 %) der 39 eingeschlossenen Patientinnen lag ein Ergebnis aus der zytologischen Untersuchung vor. Beim Vergleich der Ergebnisse aus Zytologie und Histologie zeigte sich, dass sich zytologisch auffällige Befunde häufiger bei Patientinnen fanden, bei denen auch histologisch Dysplasien nachgewiesen werden konnten. Von diesem Trend gab es allerdings Abweichungen. So wurden auf der einen Seite 26,7 % der dysplasiefreien Patientinnen in der Zytologie als höhergradig auffällig (Pap III-IV) eingestuft. Auf der anderen Seite wiesen 15,8 % der Patientinnen mit einer Dysplasie vom Grad CIN2 und höher ein zytologisch unauffälliges Ergebnis (Pap I-II) auf.

Die HPV-Testung der eingeschlossenen Patientinnen wurden mittels Multiplexed Genotyping durchgeführt. Fünf der 39 eingeschlossenen Patientinnen waren nicht mit HPV infiziert. Die verbleibenden Patientinnen waren positiv für HPV 16 bzw. 18. Wie in Tabelle 6 ersichtlich, wurde dabei der HPV-Typ 16 wesentlich häufiger nachgewiesen als der HPV-Typ 18. Vier Patientinnen waren sowohl für HPV 16 als auch HPV 18 positiv.

4.2.1.2 TESTUNG DES *RECOMWELL* HPV 16/18/45 AN DER PILOTKOHORTE

Qualitätskontrolle des *recomWell* HPV 16/18/45

Die in 3.4.1 und 3.4.2 beschriebenen Validitätskriterien wurden für jede der Messungen erfüllt. Bei Experimenten mit dem *recomWell* HPV 16/18/45 betrug die Extinktion des Blanks im Mittel 0,1180 OD₄₅₀ (0,1140 – 0,1220 OD₄₅₀; Testvalidität bei $\leq 0,5500$ OD₄₅₀). Die Extinktion der Negativkontrolle nach Blank-Korrektur lag im Mittel bei -0,0080 OD₄₅₀ (-0,0150 – -0,0010 OD₄₅₀; Testvalidität bei $\leq 0,0760$ OD₄₅₀) und die der Positivkontrolle nach Blank-Korrektur bei 1,0485 OD₄₅₀ (1,0140 – 1,0830 OD₄₅₀; Testvalidität bei $> 0,3000$ OD₄₅₀).

ERGEBNISSE

Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45

Eine Übersicht über die Testergebnisse liefert Tabelle 7. In sie fließt zudem die Histologie der Patientinnen ein. Demnach wurden Patientinnen ohne Dysplasie bzw. mit niedriggradiger Dysplasie (<CIN2) bis auf eine Ausnahme als negativ getestet. Die Patientin, die diese Ausnahme darstellt, wurde im OncoE6™ Cervical Test als dysplasiefrei eingestuft.

Tabelle 7: Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 in der Pilot-Kohorte

Histologie	n	positiv	Sensitivität	Spezifität
Dysplasiefrei, HPV negativ	5	0	*1)	100 %
Dysplasiefrei, HPV positiv	10	1	*1)	90,0 %
CIN1	5	0	0,0 %	100 %
CIN2	5	2	40,0 %	*2)
CIN3	9	3	33,3 %	*2)
Karzinom	5	5	100 %	*2)
Gesamt	39	11		
CIN2+	19	10	52,6 %	95,0 %
CIN3+	14	8	57,1 %	88,0 %

*1) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe dysplasiefrei sind

*2) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe eine Dysplasie aufweisen

4.2.1.3 TESTUNG DES ONCOE6™ CERVICAL TESTS AN DER PILOT-KOHORTE

Qualitätskontrolle des OncoE6™ Cervical Tests

In jeder der Testungen mit dem OncoE6™ Cervical Test zeigte sich eine violette Färbung der Kontroll-Linie, weshalb von einer erfolgreichen Testung ausgegangen werden kann.

ERGEBNISSE

Sensitivität und Spezifität des OncoE6™ Cervical Tests

Die Ergebnisse des OncoE6™ Cervical Tests sind im Hinblick auf die zugrundeliegende Histologie in Tabelle 8 aufgestellt. Alle 15 Patientinnen ohne Dysplasie wurden mit einer Ausnahme als negativ getestet. Die Patientin, die diese Ausnahme darstellt, wurde im *recomWell* HPV 16/18/45 als dysplasiefrei eingestuft. Es lag für diese Patientin ein HPV-16-positives Ergebnis vor, sowie ein auffälliges Kolposkopie-Ergebnis. In der nachfolgenden Biopsie zeigte sich allerdings kein Anhalt für Malignität. Bei der klinischen Nachverfolgung dieser Patientin fiel ein über vier Jahre persistenter HPV-Nachweis auf. Eine wiederholte Biopsie ergab jedoch erneut keinen Hinweis auf eine Dysplasie.

War der OncoE6™ Test positiv, so zeigte der Test auch den HPV-Typ an, dessen Onkoprotein nachgewiesen wurde. In jedem dieser Fälle war dieser angezeigte HPV-Typ der Typ mit der stärksten Intensität in der HPV-Genotypisierung.

Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität des OncoE6™ Cervical Tests in der Pilot-Kohorte

Histologie	n	positiv	Sensitivität	Spezifität
Dysplasiefrei, HPV negativ	5	0	*1)	100 %
Dysplasiefrei, HPV positiv	10	1	*1)	90,0 %
CIN1	5	2	40,0 %	60,0 %
CIN2	5	1	20,0 %	*2)
CIN3	9	3	33,3 %	*2)
Karzinom	5	5	100 %	*2)
Gesamt	39	12		
CIN2+	19	9	47,4 %	85,0 %
CIN3+	14	8	57,1 %	84,0 %

*1) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe dysplasiefrei sind

*2) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe eine Dysplasie aufweisen

ERGEBNISSE

Kombination der Ergebnisse von OncoE6™ Cervical Test und *recomWell* HPV 16/18/45 aus der Pilotkohorte

Die Aussagen aus den beiden Onkoproteintests wurden so zusammengenommen, dass das Gesamtergebnis für eine Probe „positiv“ lautete, wenn die Probe in einem der Tests ein positives Ergebnis zeigte. Waren beide Tests positiv, so war das Gesamtergebnis ebenfalls positiv, war keiner positiv, so lautete das Gesamtergebnis „negativ“. Dieser Auswertung zufolge ergeben sich Sensitivitäten und Spezifitäten, die in der nachfolgenden Tabelle 9 beschrieben sind. Durch Kombination der beiden Tests zeigt sich demnach eine erhöhte Sensitivität gegenüber den einzelnen Tests. Die Spezifität ist zugleich bei Kombination niedriger.

Tabelle 9: Sensitivität und Spezifität in der Pilot-Kohorte nach Kombination der Ergebnisse von OncoE6™ Cervical Test und *recomWell* HPV 16/18/45

Histologie	n	positiv	Sensitivität	Spezifität
Dysplasiefrei, HPV negativ	5	0	*1)	100 %
Dysplasiefrei, HPV positiv	10	2	*1)	80,0 %
CIN1	5	2	40,0 %	60,0 %
CIN2	5	2	40,0 %	*2)
CIN3	9	4	44,4 %	*2)
Karzinom	5	5	100 %	*2)
Gesamt	39	15		
CIN2+	19	11	57,9 %	80,0 %
CIN3+	14	9	64,3 %	76,0 %

*1) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe dysplasiefrei sind

*2) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe eine Dysplasie aufweisen

ERGEBNISSE

Aussagekraft konkordanter Ergebnisse von OncoE6™ Cervical Test und *recomWell* HPV 16/18/45 in der Pilotkohorte

Die beiden Onkoproteintests stimmten in 32 von 39 Fällen (82,1 %) in ihrer Aussage überein. Für acht Patientinnen gaben beide Tests ein übereinstimmend positives, für 24 ein übereinstimmend negatives Ergebnis.

Diese Ergebnisse wurden im Hinblick auf die zugrundeliegenden Dysplasiegrade beurteilt. Dabei zeigte sich, dass in allen Fällen ($n = 8$), in denen ein konkordant positives Ergebnis vorlag, ein Dysplasiegrad CIN2+ nachgewiesen worden war. In 87,5 % dieser Fälle ($n = 7$) lag ein Dysplasiegrad CIN3+ vor. Wurden die Fälle analysiert, in denen beide Onkoproteintests negativ waren, so zeigte sich, dass 66,7 % der Patientinnen ($n = 16$) keine Dysplasie oder eine Dysplasie <CIN2+ aufwiesen. Bei 79,2 % der Patientinnen ($n = 19$) mit konkordant negativem Ergebnis lag keine oder eine Dysplasie <CIN3+ vor. Ein konkordant positives Testergebnis kann demnach mit einer höheren Sicherheit auf höhergradige Dysplasien hinweisen als ein positives Testergebnis in nur einem Onkoproteintest. Dabei ist die Detektionsrate für Dysplasien vom Grad CIN2+ höher als für solche vom Grad CIN3+.

4.2.2 ERGEBNISSE AUS DER SCREENINGKOHORTE

Das Studienprotokoll der Screeningkohorte sah vor, dass eine Biopsie nur bei Patientinnen entnommen wird, die ein auffälliges Ergebnis in der kolposkopischen Untersuchung aufwiesen. Würden in die Berechnung von Sensitivität und Spezifität lediglich Patientinnen eingeschlossen werden, bei denen eine Biopsie vorlag, so würde durch diese Spezialisierung der Charakter einer Screeningkohorte verloren gehen. Um diesen Charakter beizubehalten, wurden daher zunächst Patientinnen, bei denen die Kolposkopie unauffällig war, in die Analyse eingeschlossen und als „dysplasiefrei“ eingeordnet. Die zweite Berechnung konzentrierte sich lediglich auf Patientinnen, bei denen ein Ergebnis aus der Biopsie vorlag. Als „dysplasiefrei“ galten dann nur diejenigen Patientinnen, bei denen in der histologischen Untersuchung der Biopsie keine Dysplasie nachweisbar war. Die Eigenschaften der Studienpopulation der Screeningkohorte sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

ERGEBNISSE

Tabelle 10: Beschreibung der Studienpopulation der Screeningkohorte nach histologischen Gruppen und gesamt

	Dysplasiefrei	LSIL ¹	CIN1	CIN2/CIN2-3	CIN3/ Adeno- carcinoma in situ	Karzinom	Gesamt
n (%) ²	38 (59,4)	2 (3,1)	8 (12,5)	8 (12,5)	7 (10,9)	1 (1,6)	64
Alter in Jahren ³	39 [31;44]	50 [46;55]	35 [31;44]	42 [37;43]	33 [32;34]	39 [39;39]	38 [31;42]
HPV-Testung⁴							
BD Onclarity™ HPV							
16+	18 (47,4)	1 (50)	4 (50)	8 (100)	7 (100)	1 (100)	39 (60,9)
18+	11 (28,9)	1 (50)	0	0	1 (14,3)	0	13 (20,3)
andere „high-risk“-HPV	19 (50)	0	4 (50)	4 (50)	4 (57,1)	0	31 (48,4)
HPV-Testung							
Multiplexed Genotyping¹							
6+	1 (2,6)	0	0	0	2 (28,6)	0	3 (4,7)
11+	0	0	0	0	1 (14,3)	0	1 (1,6)
16+	28 (73,7)	1 (50)	7 (87,5)	8 (100)	7 (100)	1 (100)	52 (81,3)
18+	11 (28,9)	1 (50)	2 (25)	0	1 (14,3)	0	15 (23,4)
31+	2 (5,3)	0	0	3 (37,5)	1 (14,3)	0	6 (9,4)
33+	1 (2,6)	0	0	0	0	0	1 (1,6)
39+	1 (2,6)	0	0	0	0	0	1 (1,6)
42+	1 (2,6)	0	1 (12,5)	0	0	0	2 (3,1)
45+	3 (7,9)	0	2 (25)	0	0	0	5 (7,8)
51+	3 (7,9)	0	0	1 (12,5)	0	0	4 (6,3)
52+	3 (7,9)	0	0	0	0	0	3 (4,7)
53+	1 (2,6)	0	1 (12,5)	1 (12,5)	0	0	3 (4,7)
54+	1 (2,6)	0	1 (12,5)	0	0	0	2 (3,1)
56+	1 (2,6)	0	0	0	0	0	1 (1,6)
58+	0	0	0	1 (12,5)	0	0	1 (1,6)
59+	6 (15,8)	0	0	0	1 (14,3)	0	7 (10,9)
66+	2 (5,3)	0	0	0	0	0	2 (3,1)
70+	1 (2,6)	0	0	0	0	0	1 (1,6)
72+	1 (2,6)	0	0	0	0	0	1 (1,6)
82+	4 (10,5)	0	0	0	0	0	4 (6,3)
90+	0	0	0	1 (12,5)	0	0	1 (1,6)
Zytologie⁵							
I-IIa	30 (96,8)	1 (100)	5 (62,5)	3 (37,5)	3 (42,9)	0	42 (75)
IIp-IIIID	1 (3,2)	0	3 (37,5)	2 (25)	0	0	6 (10,7)
IV	0	0	0	3 (37,5)	4 (57,1)	1 (100)	8 (14,3)
keine Zytologie	7 (-)	1 (-)	0	0	0	0	8 (-)
Kolposkopie⁶							
normal	29 (76,3)	0	0	0	0	0	29 (46)
low grade abnormal	9 (23,7)	2 (100)	7 (100)	4 (50)	5 (71,4)	1 (100)	28 (44,4)
high grade abnormal	0	0	0	4 (50)	2 (28,6)	0	6 (9,5)
N/A ⁷	0	0	1 (-)	0	0	0	1 (-)

¹ LSIL = low grade squamous intraepithelial lesion

² Angabe in n und prozentuellem Anteil an der Kohorte

³ Angaben in Median mit [oberem und unteren Quartil]

⁴ Mehrfachinfektionen möglich

⁵ nach Münchner Nomenklatur III

⁶ nach Kolposkopischer Nomenklatur nach Rio 2011

⁷ nicht verfügbar

ERGEBNISSE

4.2.2.1 BESCHREIBUNG DER STUDIENPOPULATION DER SCREENINGKOHORTE

Die eingeschlossenen Patientinnen waren im Durchschnitt 38 Jahre alt. Die jüngste Patientin war 22, die älteste 64 Jahre. Der Zeitpunkt der Abstrichnahme konnte nicht exakt ermittelt werden, da diese Daten nicht für alle Proben vorlagen. Dem Studienprotokoll ist aber zu entnehmen, dass der längste Zeitraum zwischen Abstrichnahme und Austestung 20 Monate, der kürzeste sieben Monate betrug.

Ein Zytologie-Ergebnis lag bei 56 der eingeschlossenen 64 Patientinnen (87,5 %) vor. Ein zytologisch auffälliger Befund ergab sich häufiger bei Patientinnen, die histologisch eine Dysplasie aufwiesen. Bei Patientinnen ohne Dysplasie sowie bei solchen mit einer niedriggradigen Läsion (LSIL) zeigte sich zumeist ein Zellbild, das nicht dysplasieverdächtig war (Pap I-II). Hingegen wiesen elf der 24 Patientinnen (17,2 %) mit histologisch bestätigter Dysplasie fälschlich eine unauffällige Zytologie auf.

4.2.2.2 TESTUNG DES *RECOMWELL* HPV 16/18/45 AN DER SCREENINGKOHORTE

Qualitätskontrolle des *recomWell* HPV 16/18/45

Die in 3.4.2 beschriebenen Validitätskriterien wurden für jede der Messungen erfüllt. Die Extinktion des Blanks betrug 0,1090 OD₄₅₀ (Testvalidität bei $\leq 0,5500$ OD₄₅₀). Nach Blank-Korrektur lag die Extinktion der Negativkontrolle bei 0 OD₄₅₀ (Testvalidität bei $\leq 0,0760$ OD₄₅₀) und die der Positivkontrolle bei 0,9670 OD₄₅₀ (Testvalidität bei $> 0,3000$ OD₄₅₀).

Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 bei Beurteilung von Patientinnen mit und ohne Biopsie

Wurden Patientinnen in die Analyse eingeschlossen, die keine Auffälligkeiten in der kolposkopischen Untersuchung aufwiesen, so zeigten sich Sensitivitäts- und Spezifitätswerte wie in Tabelle 11 angegeben.

ERGEBNISSE

Tabelle 11: Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 in der Screeningkohorte bei Einschluss von Patientinnen mit unauffälliger Kolposkopie

Histologie	n	positiv	Sensitivität	Spezifität
Dysplasiefrei	38	8	*1)	78,9 %
LSIL	2	1	50,0 %	50,0 %
CIN1	8	2	25,0 %	75,0 %
CIN2 oder CIN2-3	8	5	62,5 %	*2)
CIN3 oder Carcinoma in situ	7	2	28,6 %	*2)
Karzinom	1	1	100 %	*2)
Gesamt	64	19		
CIN2+	16	8	50,0 %	77,1 %
CIN3+	8	3	37,5 %	71,4 %

*1) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe dysplasiefrei sind

*2) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe eine Dysplasie aufweisen

Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 bei Konzentration ausschließlich auf Patientinnen mit Biopsie

Eine Übersicht über die Sensitivität und Spezifität des Tests in dieser Subkohorte liefert Tabelle 12. Es zeigt sich im Vergleich zur vorherigen Auswertung eine geringere Spezifität für Dysplasien bei gleicher Sensitivität.

ERGEBNISSE

Tabelle 12: Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 in der Screeningkohorte bei Einschluss lediglich Patientinnen mit gesicherter Histologie

Histologie	n	positiv	Sensitivität	Spezifität
Dysplasiefrei	7	1	*1)	85,7 %
LSIL	2	1	50,0 %	50,0 %
CIN1	8	2	25,0 %	75,0 %
CIN2 oder CIN2-3	8	5	62,5 %	*2)
CIN3 oder Carcinoma in situ	7	2	28,6 %	*2)
Karzinom	1	1	100 %	*2)
Gesamt	33	12		
CIN2+	16	8	50,0 %	76,5 %
CIN3+	8	3	37,5 %	64,0 %

*1) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe dysplasiefrei sind

*2) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe eine Dysplasie aufweisen

4.2.3 ERGEBNISSE AUS DER REFERRAL-KOHORTE

Aus den gesammelten Proben des kooperierenden Studienzentrums MVZ im Fürstenberg-Karree, 123 Hohenzollerndamm, 14199 Berlin wurden 330 Zervixabstriche von Patientinnen ausgewählt, bei denen mittels BD Onclarity™ HPV-Test einer der HPV-Typen 16, 18 oder 45 nachgewiesen wurde. Die Charakteristika dieser Population sind in Tabelle 13 dargestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle 13: Beschreibung der Studienpopulation der Referral-Kohorte nach histologischen Gruppen und gesamt

	Dysplasiefrei	CIN1	CIN2	CIN3	Karzinom	Gesamt
n (%)¹	52 (15,8)	30 (9,1)	127 (38,5)	117 (35,5)	4 (1,2)	330
Alter in Jahren²	36 [30;46]	31 [30;39]	34 [29;39]	35 [31;40]	41 [40;44]	34 [30;40]
BD Onclarity™³						
16+	35 (67,3)	16 (53,3)	97 (76,4)	94 (80,3)	2 (50)	244 (73,9)
18+	10 (19,2)	10 (33,3)	21 (16,5)	15 (12,8)	2 (50)	58 (17,6)
45+	7 (13,5)	4 (13,3)	9 (7,1)	8 (6,8)	0	28 (8,5)
Zytologie⁴						
I, II-a	19 (40,4)	9 (30)	14 (11,7)	10 (8,8)	0	52 (16,5)
II-p, II-g	3 (6,4)	1 (3,3)	8 (6,7)	3 (2,6)	0	15 (4,8)
III-p, III-g, III-x	6 (12,8)	3 (10)	15 (12,5)	26 (22,8)	1 (25)	51 (16,2)
IIID1	10 (21,3)	11 (36,7)	19 (15,8)	5 (4,4)	0	45 (14,3)
IIID2, IV	9 (19,1)	6 (20)	63 (52,5)	70 (61,4)	3 (75)	151 (47,9)
III-e	0	0	1 (0,8)	0	0	1 (0,3)
keine Zytologie	5 (-)	0	7 (-)	3 (-)	0	15 (-)
Kolposkopie⁵						
normal	9 (21,4)	3 (10)	7 (5,6)	3 (2,6)	1 (25)	23 (7,3)
minor changes	24 (57,1)	15 (50)	26 (21)	21 (18,4)	0	86 (27,4)
major changes	9 (21,4)	12 (40)	91 (73,4)	88 (77,2)	0	200 (63,7)
Karzinomverdacht	0	0	0	2 (1,8)	3 (75)	5 (1,6)
N/A⁶	10 (-)	0	3 (-)	3 (-)	0	16 (-)

¹ Angabe in n und prozentuellem Anteil an der Kohorte

² Angaben in Median mit [oberem und unteren Quartil]

³ Mehrfachinfektionen möglich

⁴ nach Münchner Nomenklatur III

⁵ nach Kolposkopischer Nomenklatur nach Rio 2011

⁶ nicht verfügbar

ERGEBNISSE

4.2.3.1 BESCHREIBUNG DER STUDIENPOPULATION DER REFERRAL-KOHORTE

Die eingeschlossenen Patientinnen waren im Durchschnitt 36,5 Jahre alt. Dabei war die jüngste Patientin 19 Jahre und die älteste 86 Jahre alt. Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors wurde die Altersverteilung der Patientinnen auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft. Die Nullhypothese, die von einer Normalverteilung der Daten ausgeht, wurde anhand eines p-Werts von $< 0,001$ abgelehnt. Der älteste Abstrich war 32 Monate, der jüngste sieben Monate alt. Im Durchschnitt lagen zwischen Abstrichnahme und Testung 15,9 Monate.

Bei 315 der eingeschlossenen 330 Patientinnen (95,5 %) lag ein Ergebnis aus der zytologischen Untersuchung vor. Zytologisch auffällige Befunde zeigten sich häufiger bei Patientinnen, bei denen auch eine auffällige Histologie diagnostiziert wurde. Doch auch unter Patientinnen, deren Histologie keinen Anhalt für eine Dysplasie gab, erhielten 53,2 % einen höhergradig auffälligen Zytologiebefund (Pap III-IV). Die Sensitivität der Zytologie für Dysplasien vom Grad CIN2+ ($n = 248$) betrug 85,9 % bei einer Spezifität von 39,0 %.

4.2.3.2 TESTUNG DES *RECOMWELL* HPV 16/18/45 AN DER REFERRAL-KOHORTE

Qualitätskontrolle des *recomWell* HPV 16/18/45

Die Proben der Referral-Kohorte wurden auf vier einzelne Messungen aufgeteilt, welche nacheinander durchgeführt wurden. Die in 3.4.2 beschriebenen Validitätskriterien wurden für jede der Messungen erfüllt. Die Extinktion des Blanks lag im Mittel bei 0,1213 OD₄₅₀ (0,1070 – 0,1390 OD₄₅₀; Testvalidität bei $\leq 0,5500$ OD₄₅₀) die der Negativkontrolle nach Blank-Korrektur bei 0,0023 OD₄₅₀ (-0,0030 – 0,0080 OD₄₅₀; Testvalidität bei $\leq 0,0760$ OD₄₅₀) und die der Positivkontrolle nach Blank-Korrektur bei 1,0818 OD₄₅₀ (1,0630 – 1,1220 OD₄₅₀; Testvalidität bei $> 0,3000$ OD₄₅₀).

ERGEBNISSE

Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 bei Einschluss von weniger als 3 mL Probenmaterial

In 40 Fällen konnte aufgrund des Verbrauchs durch andere Tests weniger als 3 mL Probenmaterial im Test eingesetzt werden. Die Extinktionen dieser Proben wurden gemäß Formel 2 mit dem Faktor multipliziert, um den weniger Material vorhanden war.

$$\text{Endextinktion} = \frac{3 \text{ mL}}{\text{Probenmenge in mL}} \times \text{Extinktion in OD}_{450}$$

Formel 2: Formel zur Berechnung der korrigierten Extinktion von Proben mit < 3 mL Probenmaterial

Die Ergebnisse des Kollektivs, das diese Proben mit geringerem Volumen enthält, wurden mit dem Kollektiv verglichen, in dem ausschließlich Proben mit 3 mL Probenmaterial eingesetzt wurden. Dabei zeigten sich Unterschiede von maximal 1,4 Prozentpunkten in Sensitivität und Spezifität (Tabelle 14). In den nachfolgenden Berechnungen gingen daher sowohl Proben mit 3 mL als auch solche mit weniger als 3 mL ein.

Tabelle 14: Gegenüberstellung von Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 für Proben mit < 3 mL Probenmaterial und für solche mit \geq 3 mL;

	CIN2+ (n)	Sensitivität CIN2+	Spezifität CIN2+
inkl. Proben < 3 mL ¹	248	31,0 %	79,3 %
nur Proben \geq 3 mL	213	31,9 %	77,9 %

	CIN3+ (n)	Sensitivität CIN3+	Spezifität CIN3+
inkl. Proben < 3 mL ¹	121	32,2 %	73,7 %
nur Proben \geq 3 mL	111	33,3 %	73,2 %

¹ OD-450-Extinktionswerte entsprechend Formel 2 korrigiert

ERGEBNISSE

Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45

Wurden die Testergebnisse auf die zugrundeliegenden Dysplasien bezogen, so ergaben sich Sensitivität und Spezifität wie in Tabelle 15 dargestellt. Es zeigte sich dabei, dass die Sensitivität mit dem Grad der Dysplasie anstieg. Die Spezifität sank mit zunehmendem Dysplasiegrad. Diese Beobachtung scheint plausibel, wenn das zugrundeliegende Testprinzip berücksichtigt wird. Da anzunehmen ist, dass mit zunehmendem Dysplasiegrad die Menge an Onkoproteinexpression steigt, kann der Test höhergradige Dysplasien leichter detektieren.

Tabelle 15: Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 in der Referral-Kohorte

Histologie	n	positiv	Sensitivität	Spezifität
Dysplasiefrei	52	10	*1)	80,8 %
CIN1	30	7	23,3 %	76,7 %
CIN2	127	38	29,9 %	*2)
CIN3 oder Carcinoma in situ	117	37	31,6 %	*2)
Karzinom	4	2	50,0 %	*2)
Gesamt	330	94		
CIN2+	248	77	31,0 %	79,3 %
CIN3+	121	39	32,1 %	73,7 %

*1) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe dysplasiefrei sind

*2) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe eine Dysplasie aufweisen

ERGEBNISSE

Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 stratifiziert nach zugrundeliegendem HPV-Typ

In einer gesonderten Analyse wurde untersucht, ob der *recomWell* HPV 16/18/45 Dysplasien häufiger erkennen kann, die durch bestimmte HPV-Typen verursacht werden. Dazu wurden die Patientinnen in Abhängigkeit von dem vorliegendem HPV-Typ in Untergruppen aufgeteilt. Bei dieser Analyse zeigten sich große Unterschiede in Sensitivität und Spezifität des Tests abhängig vom vorhandenen HPV-Typ.

Sowohl bei den mit HPV 16 als auch bei den mit HPV 45 infizierten Patientinnen lag die Sensitivität für Dysplasien vom Grad CIN2+ deutlich unter der von HPV-18-positiven Patientinnen. Die Spezifität hingegen war für HPV-16- und HPV-45-positiv Patientinnen wesentlich höher als für HPV-18-positiv Patientinnen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 in der Referral-Kohorte stratifiziert nach vorliegendem HPV-Typ

	CIN2+ (n = 248)	Sensitivität CIN2+	Spezifität CIN2+
HPV 16	193	18,7 %	90,2 %
HPV 18	38	94,7 %	45,0 %
HPV 45	17	29,4 %	90,9 %

	CIN3+ (n = 121)	Sensitivität CIN3+	Spezifität CIN3+
HPV 16	96	20,8 %	85,8 %
HPV 18	17	94,1 %	24,4 %
HPV 45	8	37,5 %	85,0 %

ERGEBNISSE

Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 stratifiziert nach Probenalter

Als möglicher Einflussfaktor auf die Testergebnisse wurde ein langer Lagerungszeitraum der Zervixabstriche erwogen. Um zu testen, ob Dysplasien aus älteren Abstrichen vom Test weniger häufig erkannt werden, wurden die Proben in Abhängigkeit von ihrem Alter aufgeteilt und getrennt analysiert. Dabei zeigte sich eine höhere Sensitivität für Proben, die älter als zwei Jahre waren. Die Spezifität war dabei durchweg geringer. Eine Übersicht der Ergebnisse gibt Tabelle 17. Eine verminderte Testleistung scheint somit bei älteren Proben unwahrscheinlich. Daher wurden auch solche Zervixabstriche in die Analyse einbezogen, deren Abnahmezeitpunkt über 24 Monate zurückliegt.

Tabelle 17: Sensitivität und Spezifität des *recomWell* HPV 16/18/45 in der Referral-Kohorte stratifiziert nach Probenalter

	CIN2+ (n)	Sensitivität CIN2+	Spezifität CIN2+
Probenalter 0-12 Monate	98	29,6 %	85,7 %
Probenalter 13-24 Monate	126	27,8 %	76,9 %
Probenalter über 24 Monate	24	54,2 %	81,3 %

	CIN3+ (n)	Sensitivität CIN3+	Spezifität CIN3+
Probenalter 0-12 Monate	70	31,4 %	78,6 %
Probenalter 13-24 Monate	43	25,6 %	73,3 %
Probenalter über 24 Monate	8	75,0 %	68,8 %

ERGEBNISSE

Korrelation der Extinktion des *recomWell* HPV 16/18/45 mit dem zugrundeliegenden Dysplasiegrad

Die Frage, ob mit zunehmendem Dysplasiegrad die Extinktion der Proben steigt, wurde anhand des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten r_s untersucht. Dabei wurde die Korrelation zunächst für alle Proben berechnet, ohne den zugrundeliegenden HPV-Typ zu berücksichtigen. Es zeigte sich, dass die Extinktion der Proben mit zunehmendem Dysplasiegrad gering steigt ($r_s = 0,151$; $p = 0,05$). In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob die Korrelation für Dysplasien, die durch bestimmte HPV-Typen verursacht werden, stärker ist. Dazu wurden die Patientinnen abhängig von ihrem zugrundeliegenden HPV-Typ in Untergruppen geteilt. Der Rangkorrelationskoeffizient r_s wurde dann für jede der Gruppen getrennt untersucht. Es ergab sich dabei eine starke Korrelation für Dysplasien, denen ein HPV-Typ 18 zugrunde lag ($r_s = 0,623$; $p = 0,01$). Die Beziehung war gering für Dysplasien, die HPV-16-positiv ($r_s = 0,152$; $p = 0,05$) waren. Für Proben, die HPV-45-positiv waren, war der Rangkorrelationskoeffizient aufgrund der geringen Probenanzahl nicht aussagekräftig ($r_s = 0,247$; $p > 0,05$).

4.2.3.3 TESTUNG DES ONCOE6™ CERVICAL TESTS AN DER REFERRAL-KOHORTE

Für die Testung mit dem OncoE6™ Cervical Test wurden die Zervixabstriche von solchen Patientinnen ausgewählt, die laut BD Onclarity™ HPV-Test eine Infektion mit dem HPV-Typ 16 oder 18 aufwiesen. Dieses Auswahlkriterium traf auf 302 der 330 Patientinnen der Referral-Kohorte zu. Patientinnen, die mit HPV 45 infiziert waren ($n = 28$), wurden ausgeschlossen.

ERGEBNISSE

Qualitätskontrolle des OncoE6™ Cervical Tests

In sieben Fällen war nach Testung die Kontroll-Linie auf dem Teststreifen nicht vollständig sichtbar. Ein Teststreifen mit unvollständiger Kontroll-Linie spricht für einen Fehler in der Abarbeitung oder im Testlauf und kann kein sicheres Ergebnis liefern. Diese sieben Proben wurden ausgeschlossen und nicht weiter in die Untersuchung einbezogen.

Beschreibung der Studienpopulation der Referral-Kohorte für die Testung mit dem OncoE6™ Cervical Test

Von den verbleibenden 295 Patientinnen waren gemäß BD Onclarity™ HPV-Test 237 Patientinnen (80,3 %) mit HPV 16 und 58 Patientinnen (19,7 %) mit HPV 18 infiziert. Die jüngste Patientin war 19 Jahre, die älteste 86 Jahre alt. Im Durchschnitt waren Patientinnen bei Abstrichnahme 36,2 Jahre alt. Der jüngste Abstrich war sieben Monate, der älteste 32 Monate alt. Zwischen Abstrichnahme und Testung lagen im Durchschnitt 15,5 Monate.

Die getesteten Patientinnen wiesen Dysplasiegrade mit folgender Häufigkeit auf: Keine dysplastischen Veränderungen waren bei 45 Patientinnen (15,3 %) nachweisbar. Der Dysplasiegrad CIN1 wurde bei 25 Patientinnen (8,5 %) nachgewiesen, CIN2 bei 114 Patientinnen (38,6 %) und CIN3 bzw. Carcinoma in situ bei 107 Patientinnen (36,3 %). Vier Patientinnen wiesen ein invasives Plattenepithelkarzinom auf, was 1,4 % der getesteten Patientinnen entspricht.

In 182 Fällen lag im OncoE6™ Cervical Test ein positiver Nachweis für das E6 Onkoprotein des HPV-Typs 16 oder 18 vor. Der HPV-Typ, der im OncoE6™ Cervical Test angegeben wurde, stimmte in allen Fällen mit dem HPV-Typ überein, der durch den BD Onclarity™ HPV-Test nachgewiesen wurde.

ERGEBNISSE

Sensitivität und Spezifität des OncoE6™ Cervical Tests

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Patientin mit Dysplasie vom Test als positiv erkannt wurde, stieg mit zunehmendem Dysplasiegrad. Gleichzeitig sank die Spezifität mit zunehmendem Dysplasiegrad. Im Detail sind die Sensitivität und Spezifität in Tabelle 18 dargestellt. Es zeigt sich eine gegenüber dem *recomWell* HPV 16/18/45 deutlich erhöhte Sensitivität für höhergradige Dysplasien. Die Spezifität ist zugleich niedriger.

Tabelle 18: Sensitivität und Spezifität des OncoE6™ Cervical Tests in der Referral-Kohorte

Histologie	n	positiv	Sensitivität	Spezifität
normal	45	15	*1)	66,7 %
CIN1	25	8	32,0 %	68,0 %
CIN2	114	71	62,3 %	*2)
CIN3 oder Carcinoma in situ	107	84	78,5 %	*2)
Karzinom	4	4	100 %	*2)
Gesamt	295	182		
CIN2+	225	159	70,7 %	67,1 %
CIN3+	111	88	79,3 %	48,9 %

*1) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe dysplasiefrei sind

*2) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe eine Dysplasie aufweisen

ERGEBNISSE

Sensitivität und Spezifität des OncoE6™ Cervical Tests stratifiziert nach zugrundeliegendem HPV-Typ

Wurden die Ergebnisse nach vorliegendem HPV-Typ getrennt ausgewertet, so zeigte sich, dass Dysplasien, die durch HPV 18 induziert werden, besser erkannt werden. Sowohl für Dysplasiegrade CIN2+ als auch für CIN3+ war die Sensitivität für HPV-18-positive Dysplasien wesentlich höher als bei HPV-16-positiven. Die Spezifität für CIN2+ war ebenfalls höher für HPV-18-positive Patientinnen, während sie für CIN3+ geringfügig niedriger war (Tabelle 19).

Tabelle 19: Sensitivität und Spezifität des OncoE6™ Cervical Tests in der Referral-Kohorte stratifiziert nach vorliegendem HPV-Typ

	CIN2+ (n = 225)	Sensitivität CIN2+	Spezifität CIN2+
HPV 16	187	67,9 %	64,0 %
HPV 18	38	84,2 %	75,0 %

	CIN3+ (n = 111)	Sensitivität CIN3+	Spezifität CIN3+
HPV 16	94	76,6 %	49,0 %
HPV 18	17	94,1 %	48,8 %

Sensitivität und Spezifität des OncoE6™ Cervical Tests stratifiziert nach Probenalter

Um zu untersuchen, ob Dysplasien in älteren Proben schlechter erkannt werden, wurden die Abstriche abhängig vom Alter der Proben getrennt analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Sensitivität für Dysplasien in Proben, die innerhalb eines Jahres analysiert wurden, im Vergleich zu länger gelagerten Proben geringer war. Die Spezifität war dabei höher, wie Tabelle 20 zeigt.

ERGEBNISSE

Tabelle 20: Sensitivität und Spezifität für den OncoE6™ Cervical Test in der Referral-Kohorte stratifiziert nach Probenalter

	CIN2+ (n)	Sensitivität CIN2+	Spezifität CIN2+
Probenalter 0-12 Monate	92	96,6 %	71,4 %
Probenalter 13-24 Monate	115	67,8 %	65,1 %
Probenalter über 24 Monate	18	94,4 %	69,2 %

	CIN3+ (n)	Sensitivität CIN3+	Spezifität CIN3+
Probenalter 0-12 Monate	66	74,2 %	52,5 %
Probenalter 13-24 Monate	39	84,6 %	49,6 %
Probenalter über 24 Monate	6	100 %	40,0 %

Korrelation der Intensität der Ergebnislinie des OncoE6™ Cervical Tests mit dem zugrundeliegenden Dysplasiegrad

Der Zusammenhang zwischen der Intensität der Ergebnislinie einer Probe im OncoE6™ Cervical Test und dem zugrundeliegenden Dysplasiegrad wurde anhand des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten r_s untersucht. Die Linienintensität korrelierte moderat mit dem Dysplasiegrad, wenn Proben unabhängig von dem vorliegenden HPV-Typ beurteilt wurden ($r_s = 0,345$; $p = 0,01$). Eine starke Korrelation zeigte sich bei Proben, denen der HPV-Typ 18 zugrunde lag ($r_s = 0,670$; $p = 0,01$). In Proben, die mit HPV 16 infiziert waren, war der Zusammenhang moderat ($r_s = 0,268$; $p = 0,01$).

ERGEBNISSE

4.2.3.4 KOMBINIERTER ANALYSE DES *recomWell* HPV 16/18/45 UND ONCOE6™ CERVICAL TESTS

Kombination der Ergebnisse von *recomWell* HPV 16/18/45 und OncoE6™ Cervical Test

In den Fällen, in denen sowohl der *recomWell* HPV 16/18/45 als auch der OncoE6™ Cervical Test durchgeführt wurde (n = 295), wurden die Resultate wie unter 4.2.1.3 beschrieben für eine gemeinsame Analyse zusammengeführt.

Sensitivität und Spezifität bei Kombination der Ergebnisse des *recomWell* HPV 16/18/45 und des OncoE6™ Cervical Tests

Durch die Kombination der Testergebnisse war die Sensitivität für Dysplasien höher als bei den einzelnen Tests. Die Spezifität war hingegen geringer (Tabelle 21).

Tabelle 21: Sensitivität und Spezifität in der Referral-Kohorte nach Kombination der Ergebnisse

Histologie	n	mindestens ein Test positiv	Sensitivität	Spezifität
normal	45	21	*1)	53,3 %
CIN1	25	11	44,0 %	56,0 %
CIN2	114	81	71,1 %	*2)
CIN3 oder Carcinoma in situ	107	86	80,4 %	*2)
Karzinom	4	4	100 %	*2)
Gesamt	295	203		
CIN2+	225	171	76,0 %	54,3 %
CIN3+	111	90	81,1 %	38,6 %

*1) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe dysplasiefrei sind

*2) Berechnung ungeeignet, da alle Patientinnen dieser Gruppe eine Dysplasie aufweisen

ERGEBNISSE

Aussagekraft konkordanter Ergebnisse des *recomWell* HPV 16/18/45 und des OncoE6™ Cervical Tests

In 158 von 295 Fällen (53,6 %) erbrachten beide Onkoproteintests das gleiche Ergebnis. Davon waren 66 konkordant positiv und 92 konkordant negativ. In 137 Fällen zeigten die Onkoproteintests ein divergentes Ergebnis. Bei der Untersuchung konkordanter Ergebnisse im Hinblick auf die zugrundeliegenden Dysplasiegrade, zeigte sich, dass in 89,4 % (n = 59) der konkordant positiven Ergebnisse ein Dysplasiegrad CIN2+ und in 51,5 % (n = 34) ein Dysplasiegrad CIN3+ vorlagen. Unter den Patientinnen mit konkordant negativem Ergebnis hatten 41,3 % (n = 38) einen Dysplasiegrad kleiner als CIN2 und 77,2 % (n = 71) einen Dysplasiegrad kleiner als CIN3.

Zusammenhang der Ergebnisse des *recomWell* HPV 16/18/45 und des OncoE6™ Cervical Tests

Um zu untersuchen, wie die Ergebnisse aus den beiden Onkoproteintests zusammenhängen, wurden zwei verschiedene statistische Tests verwendet. Zunächst wurde mithilfe des Phi-Kontingenzkoeffizienten untersucht, wie die Aussage des *recomWell* HPV 16/18/45 und des OncoE6™ Cervical Tests miteinander übereinstimmen. Dabei ergab sich ein schwacher positiver Zusammenhang mit einem Phi-Kontingenzkoeffizient von $\phi = 0,188$ ($p = 0,001$). Anschließend wurde anhand des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten untersucht, wie stark die Extinktion der Proben im *recomWell* HPV 16/18/45 und die Intensität der Ergebnislinie im OncoE6™ Cervical Test miteinander korrelieren. Es zeigte sich dabei eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizient r_s von 0,389 ($p < 0,001$), was einem moderaten Zusammenhang entspricht.

5 DISKUSSION

Mit dem Jahr 2020 wurde in Deutschland ein neues Programm zur Früherkennung von Gebärmutterhalskrebs eingeführt. Neu ist dabei, dass der Screeningalgorithmus die Infektion mit dem humanen Papillomvirus (HPV) berücksichtigt, welche die notwendige Voraussetzung für die Entstehung eines Zervixkarzinoms ist (Walboomers et al., 1999). Die Infektion mit HPV führt allerdings nicht zwangsläufig zu einer Krebserkrankung. Etwa 90 % der Infektionen verlaufen transient und sind damit nicht karzinogen (Ho et al., 1998). Da der HPV-Test allerdings auch transiente benigne Infektionen erkennt, ist eine weitere Abgrenzung zu dysplastischen Veränderungen notwendig. Entsteht auf dem Boden einer HPV-Infektion eine Dysplasie, so steigt die Expression der viralen Onkoproteine an (Isaacson Wechsler et al., 2012). Auf dieser Besonderheit lassen sich Forschungsansätze aufbauen. So erlaubt dieses Merkmal die Hypothese, dass eine erhöhte Expression der Onkoproteine unter Umständen eine karzinogene Entwicklung anzeigt. Neue innovative Onkoproteintests könnten die Möglichkeit bieten, eine gesteigerte Onkoproteinexpression zu messen. Mit ihnen verbindet sich die Erwartung, anhand der Messung viraler Onkoproteine Rückschlüsse auf eine transformierende Infektion ziehen zu können. So lässt sich auf Basis dieser Methode annehmen, dass Onkoproteine eine höhergradige Dysplasie gegebenenfalls präziser erkennen als der HPV-Test. Die vorliegende Dissertation formuliert dazu folgende Arbeitshypothese: Onkoproteintests sind dem HPV-Test hinsichtlich Sensitivität und Spezifität nicht unterlegen. Die Nebenhypothese, dass die Onkoproteintests im Screening als Abklärungstests dienen können, wird gesondert untersucht.

Um diese Hypothesen auf ihre Berechtigung hin zu überprüfen, kombinierte die vorliegende Studie zwei innovative Onkoproteintests miteinander. Zum einen wurde der *recomWell* HPV 16/18/45 der Firma Mikrogen Diagnostik GmbH (Neuried, Deutschland) angewendet, dessen Zielprotein das virale Onkoprotein E7 ist. Zum anderen kam der *OncoE6™* Cervical Test der Arbor Vita Corporation (Fremont, CA, USA) zum Einsatz, der das virale Onkoprotein E6 nachweist. Erstmals wurden beide Tests an der gleichen Kohorte eingesetzt. Die auf diese Weise gewonnenen Ergebnisse erlauben Aussagen über den möglichen Stellenwert der Tests im Gebärmutterhalskrebscreening.

DISKUSSION

Die Herstellerfirmen unterstützten die vorliegende Studie, indem sie ihre Testkits kostenlos zur Testung zur Verfügung stellten. Anschließend erfolgte Kontakt, um offene Fragen in der Testabarbeitung zu klären. Die dabei erhaltenen Hinweise wurden sorgfältig auf ihre Berechtigung überprüft. Die Entscheidung zur Umsetzung dieser Ratschläge erfolgte in steter Abstimmung mit dem Promotionsbegleiter. Weder in Hinblick auf die Fragestellung sowie die Methode noch die Interpretation der Ergebnisse fanden Absprachen mit den Herstellerfirmen statt.

Nachfolgend werden in 5.1 die in Punkt 2 aufgestellten Hypothesen anhand der in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse diskutiert. Limitationen dieser Ergebnisse zeigt 5.2 auf. Anschließend vergleicht Abschnitt 5.3 die gewonnenen Erkenntnisse mit denen anderer Studien. Abschließend werden die Ergebnisse vor den zuvor diskutierten Hintergründen beurteilt und in Hinblick auf künftige Forschungsansätze eingeordnet.

5.1 HYPOTHESENBEZOGENE ERGEBNISDISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu prüfen, welchen Stellenwert innovative Onkoproteintests im Zervixkarzinomscreening haben können. Um diese Frage beantworten zu können, schien es angebracht, vier wesentliche Aspekte zu beurteilen. Erstens ist die Idee des Testsystems an sich zu begutachten. Zweitens ist die diagnostische Wertigkeit der Onkoproteintests zu überprüfen. Die Praktikabilität der Abarbeitung ist als dritter Aspekt zu berücksichtigen. Als nicht zu vernachlässigender vierter Aspekt sind die Kosten, die mit der Testung einhergehen, zu untersuchen.

DISKUSSION

Auf der Basis vorbereitender Messungen und methodischer Anpassungen wurde das Studiendesign entworfen. Um die Messungen an Patientinnenkohorten vergleichend durchführen zu können, war es notwendig, die Arbeitsschritte des Standardprotokolls zu modifizieren. Diese Modifikationen ermöglichten es, Messungen an größeren Patientinnenkohorten und bei begrenztem Probenvolumen vergleichend durchzuführen. Nachdem die Tests an einer Pilotkohorte valide Ergebnisse lieferten, war die Durchführbarkeit der nachfolgenden Experimente gesichert. Anschließend wurde der *recomWell* HPV 16/18/45 an Patientinnen einer Screeningkohorte angewendet. Die reichhaltigste Datenbasis konnte aus der letzten der drei Kohorten, der Referral-Kohorte, erzielt werden. Die nachfolgenden Schlussfolgerungen stützen sich daher vor allem auf diese Ergebnisse.

5.1.1 DESIGN DER TESTSYSTEME

Eine große Limitation des Screenings vor 2020 bestand darin, dass mit der Zervixzytologie ein Verfahren im Fokus der Diagnostik stand, dessen Analyseergebnis stark von Interpretationen abhängig ist. Studien stuften die Übereinstimmung der Beurteilung eines Abstriches durch unterschiedliche Zytopathologen lediglich als moderat ein ($k = 0,46-0,60$; Sheffield et al., 2003; Stoler et al., 2001). Von diesem Ausgangspunkt her ist die Einführung des Tests auf HPV-DNA ein großer Fortschritt. Das HPV-Genmaterial wird anhand eines automatisierten Read-outs nachgewiesen, was den Spielraum für eine interpretative Variabilität gering hält.

DISKUSSION

Dem Funktionsprinzip eines ELISAs folgend, weist der *recomWell* HPV 16/18/45 das Onkoprotein E7 der HPV-Typen 16, 18 und 45 nach. Der Nachweis erfolgt anhand einer Farbreaktion, deren Intensität photometrisch gemessen wird. Liegt die photometrische Extinktion über einem definierten Cut-off, so ist ein positiver Nachweis für das Onkoprotein E7 gegeben. Dadurch kann eine qualitative Aussage über das Vorliegen des Onkoproteins und das Bestehen einer HPV-Infektion getroffen werden. Aufgrund der automatisierten Ergebnisausgabe durch das Photometer kann der *recomWell* HPV 16/18/45 als objektives Verfahren angesehen werden. Der OncoE6™ Cervical Test nutzt das Prinzip der Chromatographie. Ähnlich einem Schwangerschaftstest zeigt sich der positive Nachweis des Onkoproteins anhand einer farbigen Linie auf dem Ablesestreifen. Die Intensität der Linie gibt Hinweise auf die Menge des gemessenen Onkoproteins und liefert damit ein semiquantitatives Ergebnis. Linien mit geringer Farbintensität, die laut Protokoll als positiver Nachweis zu bewerten sind, können schwer erkennbar sein und damit der Detektion entgehen. Eine Variabilität in der Beurteilung des Ergebnisses ist daher nicht vollständig auszuschließen.

DISKUSSION

Wird das Testsystem der in der vorliegenden Arbeit evaluierten Onkoproteintests untersucht, muss diskutiert werden, welche HPV-Typen von den Tests erkannt werden. Für HPV-Tests, die im Screening für Gebärmutterhalskrebs zum Einsatz kommen sollen, hat der Gemeinsame Bundesausschuss (GBA) in seinem Beschluss zur Änderung der Krebsfrüherkennungs-Richtlinie von 2018 ein Typenspektrum festgelegt. Erkannt werden müssen mindestens die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2018a) im Primärscreening. Dem gegenüber steht das wesentlich eingeschränktere Spektrum der hier untersuchten Onkoproteintests. Während der *recomWell* HPV 16/18/45 das Onkoprotein E7 der HPV-Typen 16, 18 und 45 detektiert, weist der OncoE6™ Cervical Test das Onkoprotein E6 der HPV-Typen 16 und 18 nach. Diese Beschränkung scheint nicht unproblematisch, da etwa 30 % der invasiven Karzinome weder mit HPV 16 noch mit HPV 18 assoziiert sind (de Sanjose et al., 2010; Li et al., 2011). Zudem ist erwartbar, dass es durch die Impfung zu einer allmählichen Immunisierung gegen die HPV-Typen 16 und 18 kommt. Infolgedessen ist es denkbar, dass sich dadurch ein Feld eröffnet, auf dem für die übrigen HPV-Typen günstige Ausgangsbedingungen entstehen. Karzinome, die mit den Typen 16 oder 18 assoziiert sind, könnten seltener werden. An deren Stelle träten dann Krebsformen, die auf die Infektion mit anderen „high-risk“-Typen zurückgehen. Erste Studien, die sich dieser Problematik gezielt zuwandten, zeigen bisher inkonsistente Ergebnisse. Während manche Autoren keine Anzeichen für eine Veränderung des Typenspektrums ausmachen konnten (Kavanagh et al., 2014; Saccucci et al., 2018), berichteten andere über eine signifikante Zunahme der HPV-Typen 52 und 56 (Soderlund-Strand et al., 2014) in gegen HPV-geimpften Kohorten. Die weitere Entwicklung sollte aufmerksam verfolgt werden, da in Abhängigkeit verlässlicher Ergebnisse auch der Nutzen der Onkoproteintests neu bewertet werden muss.

5.1.2 DIE DIAGNOSTISCHE WERTIGKEIT DER TESTS

In der Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit eines Tests stehen die statistischen Maße von Sensitivität und Spezifität im Vordergrund. Für HPV-Tests, die im Zervixkarzinomscreening zum Einsatz kommen, gibt der GBA in seinem Beschluss über eine Änderung der Krebsfrüherkennungs-Richtlinie von 2018 Regeln vor. Er fordert, dass die Tests „mindestens 90 % der Sensitivität für CIN2+ eines etablierten und validierten HPV-Tests und mindestens 98 % der Spezifität für CIN2+ eines etablierten und validierten HPV-Tests bei Frauen ab einem Alter von 30 Jahren haben“ (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2018a). Ein solcher etablierter und validierter HPV-Test ist der BD Onclarity™ HPV-Test, der in der vorliegenden Dissertation eingesetzt wurde. Für Dysplasien vom Grad CIN2+ weist er eine Sensitivität von 90,5 % bei einer Spezifität von 84,2 % auf (Li et al., 2020).

Die Tabelle 22 stellt die Sensitivität und Spezifität für Dysplasien vom Grad CIN2+ der untersuchten Onkoproteintests den Werten der Tests gegenüber, die aktuell im Zervixkarzinomscreening zum Einsatz kommen. Die Übersicht zeigt eine klare Überlegenheit des BD Onclarity™ HPV-Tests. Der *recomWell* HPV 16/18/45 erweist sich demnach als wesentlich weniger sensitiv als im GBA-Beschluss verlangt. Ebenso ist er gegenüber der zytologischen Untersuchung eines Abstrichs unterlegen. Der OncoE6™ Cervical Test weist zwar eine höhere Sensitivität als der *recomWell* HPV 16/18/45 auf, liegt aber ebenfalls unter den vom GBA geforderten Werten, sowie unter denen der Zytologie. Auch hinsichtlich der Spezifität können die beiden Onkoproteintests die Voraussetzungen des GBA-Beschlusses nicht erreichen. Sie zeigen aber eine höhere Spezifität als der zytologische Abstrich.

Tabelle 22: Sensitivität und Spezifität der untersuchten Onkoproteintests im Vergleich zum BD Onclarity™ HPV-Test (Li et al., 2020)

	CIN2+ (n)	Sensitivität CIN2+	Spezifität CIN2+
Zytologie (anhand der Referral-Kohorte)	248	85,9 %	39,0 %
BD Onclarity™ HPV-Test nach Li et al., 2020	11.122	90,5 %	84,2 %
<i>recomWell</i> HPV 16/18/45	248	31,0 %	79,3 %
OncoE6™ Cervical Test ¹	225	70,7 %	67,1 %
Onkoproteintests Kombinationsanalyse ¹	225	76,0 %	54,3 %

¹ HPV-16- und HPV-18-positive Dysplasien

DISKUSSION

Beide Tests weisen klare Unterschiede in der Sensitivität und Spezifität auf, wenn Patientinnen hinsichtlich der den Dysplasien zugrundeliegenden HPV-Typen untersucht wurden. Dysplasien, denen der HPV-Typ 18 zugrunde lag, werden sowohl im *recomWell* HPV 16/18/45 als auch im OncoE6™ Cervical Test mit der höchsten Sensitivität erkannt. Besonders groß sind die Unterschiede in den Ergebnissen der Testreihe mit dem *recomWell* HPV 16/18/45 (Sensitivitätsunterschied für Dysplasien CIN2+ HPV 16 zu HPV 18: -76 %; HPV 45 zu HPV 18: -65,3 %). Weniger deutliche Unterschiede treten im OncoE6™ Cervical Test (Sensitivitätsunterschied für Dysplasien CIN2+ HPV 16 zu HPV 18: -16,3 %) zutage.

Hinsichtlich Sensitivität und Spezifität erfüllen die Onkoproteintests die Voraussetzungen des GBAs für das Primärscreening nicht. In einer zusätzlichen Analyse wurde daher untersucht, ob eine Kombination der Ergebnisse beider Tests einen diagnostischen Mehrwert bringen kann. Eine Patientin galt durch diese Kombination als positiv, wenn mindestens einer der Tests sie als positiv klassifizierte. War das Ergebnis in beiden Tests negativ, so wurde die Patientin als negativ gewertet. Die Tabelle 22 zeigt die Sensitivität und Spezifität für diese Kombinationsanalyse.

DISKUSSION

Im Vergleich zu den Ergebnissen für die Onkoproteintests alleine bedeutet die Kombination der Ergebnisse beider Tests eine enorme Veränderung der Sensitivität. Im Vergleich zur alleinigen *recomWell* HPV 16/18/45-Testung ist die Sensitivität durch Kombination beider Tests um 45 Prozentpunkte höher. Beim Vergleich zwischen Kombinationstestung und OncoE6™ Cervical Test alleine beträgt dieser Unterschied 5,3 Prozentpunkte. Ein derart großer Unterschied war zu erwarten, da die Sensitivität des *recomWell* HPV 16/18/45 deutlich geringer ist als die des OncoE6™ Cervical Tests (Tabelle 22). Die Anzahl der richtig positiven Ergebnisse nahm durch Kombination beider Tests zu, da beide Tests in den verschiedenen Dysplasiegruppen unterschiedlich viele Befunde falsch negativ beurteilt haben. Dies erklärt die höhere Sensitivität in der Kombinationstestung gegenüber den einzelnen Tests. Da die falsch positiven Ergebnisse der jeweiligen Tests sich addieren, führt die Kombination der Tests aus sich heraus zu einer niedrigen Spezifität. In der Gegenüberstellung der Spezifitäten von Kombinationsanalyse und individueller Onkoproteintestung beläuft sich der Unterschied bei der *recomWell* HPV 16/18/45 Testung auf 25 Prozentpunkte. Beim OncoE6™ Cervical Test macht die Differenz 12,8 Prozentpunkte aus. Wie Tabelle 22 zum Ausdruck bringt, reicht die Sensitivität für Dysplasien auch durch Kombination der Onkoproteintests nicht an die im GBA-Beschluss vorgeschriebenen Werte heran. Es ist nicht zu übersehen, dass der Vorteil einer höheren Sensitivität, die eine Kombination der Tests mit sich bringt, mit dem nicht zu unterschätzenden Nachteil einer niedrigen Spezifität einhergeht. Eine Kombination der Testergebnisse scheint daher gegenüber dem alleinigen Einsatz eines Onkoproteintests keinen ausreichenden Vorteil zu bringen.

DISKUSSION

Aufgrund der großen Differenzen der Sensitivität und Spezifität der beiden Tests kann angenommen werden, dass ihre Aussagen für die einzelne Patientin häufig unterschiedlich sind. Auf die geringe Übereinstimmung lassen auch die niedrigen Werte der Korrelation der Ergebnisse schließen (Phi-Kontingenzkoeffizient $\phi = 0,188$ bei $p = 0,001$ und Spearman Rangkorrelationskoeffizient $r_s = 0,389$ bei $p < 0,001$). Tatsächlich klassifizieren die beiden Tests in nur 53,6 % der Fälle eine Patientin übereinstimmend als positiv bzw. als negativ. Liefern beide Tests ein positives Ergebnis, so liegt in 89,4 % dieser Fälle eine Dysplasie vom Grad CIN2+ vor. Sind beide Tests negativ, so liegt in 41,3 % der Fälle keine oder eine lediglich geringgradige Dysplasie vom Grad CIN1 zugrunde. Ein übereinstimmend positives Ergebnis kann damit relativ verlässlich eine Dysplasie anzeigen. Ist allerdings nur einer der beiden Tests positiv oder zeigen beide ein negatives Ergebnis, so ist keine sichere diagnostische Aussage zu treffen.

Der klinische Hintergrund dieser nur teilweise befriedigenden Ausgangslage bleibt zu diskutieren. Eine naheliegende Erklärung für die geringe Übereinstimmung der Ergebnisse ist der in Tabelle 22 gezeigte Sensitivitätsunterschied der beiden Tests. Der OncoE6™ Cervical Test erkennt demnach Dysplasien mit einer um 39,7 Prozentpunkte höheren Sensitivität als der *recomWell* HPV 16/18/45. Bevor man diesen Schluss zieht, ist zu erwägen, ob eine mögliche Erklärung in einer diagnostischen Spezifizierung bestehen könnte. Die hohen Raten von regredienten Dysplasien lassen vermuten, dass innerhalb eines Dysplasiegrades verschiedene Unterarten von Dysplasien existieren. Diese Unterarten entwickelten sich mit unterschiedlicher Dynamik zum Karzinom. Würde einer der Tests vermehrt Dysplasien mit höherer Progredienzneigung entdecken als der andere Test, wäre das eine wichtige diagnostische Zusatzinformation und könnte die geringe Übereinstimmung der beiden Tests erklären. In dieser Frage könnte die Nachverfolgung des Patientinnenkollektivs im Rahmen einer Follow-up-Studie wertvolle Ergebnisse liefern.

DISKUSSION

Von großer Bedeutung zur Beurteilung der medizinischen Wertigkeit einer diagnostischen Maßnahme sind der negativ und positiv prädiktive Wert. Bei der Referral-Kohorte handelt es sich allerdings nicht um eine repräsentative Kohorte, sodass die Häufigkeiten der Dysplasien nicht mit denen der Allgemeinbevölkerung übereinstimmen. Eine Berechnung der Vorhersagewerte auf Grundlage dieser Kohorte war daher nicht möglich. Es wurde daher auf die Berechnung der Vorhersagewerte verzichtet, weshalb diese nicht als Kriterium zur Beurteilung der Tests herangezogen werden können.

5.1.3 DER ZEIT- UND ARBEITSAUFWAND

Beide Tests erfordern einen Abstrich der Zervixoberfläche, um das Probenmaterial zu gewinnen. Dieser Abstrich wird routinemäßig für die zytologische Untersuchung und den HPV-Test abgenommen, der gleiche Abstrich und das Fixiermedium können in die Onkoproteintests eingehen. Daher verursacht dieser erste Schritt bei der Anwendung der Onkoproteintests keinen zusätzlichen Arbeitsschritt. Die Abarbeitung beider Tests kann in eine Vorbereitungszeit und eine Testzeit aufgeteilt werden. In der Vorbereitung erfordern beide Tests zunächst die Trennung der eingesetzten Zellen von ihrem Lagerungsmedium und anschließend die Zellyse. Die Vorbereitungszeit beträgt bei beiden Tests etwa 40 Minuten pro Probe. Bei der Durchführung des *recomWell* HPV 16/18/45 sind 30 Minuten davon reine Inkubationszeit, in der keine weiteren Schritte umgesetzt werden müssen. Die Vorbereitung des OncoE6™ Cervical Tests beinhaltet mehrere kürzere Inkubationszeiten von acht bis zehn Minuten und erfordert daher mehr Arbeitsschritte als die des *recomWell* HPV 16/18/45. Der sich an die Vorbereitung anschließende Bearbeitungsaufwand ist für beide Tests ebenfalls sehr unterschiedlich.

DISKUSSION

recomWell HPV 16/18/45

Wie es bei ELISAs üblich ist, kommt im *recomWell* HPV 16/18/45 eine antikörperbeschichtete 96-Well Platte zum Einsatz. Da drei Wells mit der Positiv- und Negativkontrolle sowie mit dem Blindwert (Blank) belegt sind, stehen für die Messung von Patientinnenproben 93 Wells zur Verfügung. Die Austestung nimmt etwa vier Stunden und 15 Minuten in Anspruch. Die Zeit, in der der Test ein aktives Arbeiten erfordert (hands-on-time), beträgt 45 Minuten. Während der Inkubationszeiten (drei Inkubationen zu jeweils einer Stunde, eine Inkubationszeit zu 30 Minuten) müssen keine weiteren Schritte durchgeführt werden. Bezogen auf die einzelne Probe bedeuten diese Gegebenheiten einen relativ geringen Einsatz von Zeit.

Wie in den vorliegenden Ergebnissen zu erkennen ist, ist bei der Testung älterer Proben nicht mit einem Sensitivitätsverlust zu rechnen. Die Testung des *recomWell* HPV 16/18/45 an der Referral-Kohorte beinhaltete Proben, die zwischen sieben und 32 Monaten gelagert worden waren. Bei der gesonderten Analyse von Proben, die älter als zwei Jahre waren, zeigt sich keine geringere Sensitivität für Dysplasien vom Grad CIN2+ als für Proben, deren Lagerungszeitraum kürzer war. Vielmehr ist die Sensitivität für CIN2+ für über zwei Jahre alte Proben um 24,6 Prozentpunkte höher als für Proben, die vor weniger als einem Jahr abgenommen worden waren. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist die Tatsache, dass in der Gruppe der älteren Proben wesentlich weniger höhergradige Dysplasien enthalten waren. Der Anteil von Dysplasien vom Grad CIN2+ beträgt in der Gruppe der über zwei Jahre alten Proben 60,0 %. In der Gruppe der Proben, die vor weniger als 13 Monaten abgenommen worden waren, macht dieser Anteil 87,5 % aus. Wird von einer generell niedrigen Sensitivität des *recomWell* HPV 16/18/45 für Dysplasien ausgegangen, so zeigt sich diese stärker in einem Kollektiv mit einer großen Zahl von Dysplasien.

DISKUSSION

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein Lagerungszeitraum von über zwei Jahren die Zuverlässigkeit der Testung nicht wesentlich beeinträchtigt. Zeiträume dieser Größenordnung sind für die Routinetestung weniger relevant als für den Einsatz des Tests im vorliegenden Forschungszusammenhang. In der klinischen Testung sind Zeiträume von unter einem Monat zur Abklärung die Regel. Ob es Sensitivitätsunterschiede in der Testung von Proben gibt, die zwischen einem und mehr Monaten alt sind, ist aus den vorliegenden Ergebnissen nicht zu ersehen. Die Herstellerfirma des *recomWell* HPV 16/18/45 garantiert noch ein verlässliches Ergebnis, sofern die Abstriche innerhalb von 14 Tagen im Test eingesetzt werden (Mikrogen Diagnostik GmbH, 2017).

Zudem zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die arbeitsintensive Waschung der Mikrotiterplatte von einem ELISA-Washergerät übernommen werden kann. Patientinnenproben, die manuell gewaschen wurden, wurden mit solchen, bei denen der ELISA-Washer zum Einsatz kam, mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichen. Es ergibt sich dabei kein relevanter Unterschied der Extinktionen und der Testsensitivität ($p = 0,09$). Dieser Umstand trägt dazu bei, dass der Laboraufwand für die Einbindung des E7 sehr gering sein kann.

DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass kleinere Ungenauigkeiten, die bei einer zügigen Testabarbeitung entstehen können, die Testleistung nicht beeinträchtigen. In der Vorbereitung der Proben kann es vorkommen, dass eine kleine Menge von ThinPrep®-Lagerungsmedium nicht wie vorgeschrieben vollständig entfernt werden kann. Ist dies der Fall, so unterscheidet sich die Extinktion nur geringfügig von der Extinktion einer Probe, in der das ThinPrep® vollständig entfernt wurde (Idealprobe). Im Mittel ist die Extinktion der Probe mit zusätzlichem ThinPrep® um 0,2 % höher, wenn die Menge zugegebenen Lagerungsmediums 10 % des Endlysevolumens beträgt. Die Abstände zur Idealprobe sind größer, wenn mehr ThinPrep® zugegeben wird. Es lassen sich hier sowohl Zunahmen wie Abnahmen der Extinktionen beobachten. Dabei ist eine Menge von 10 % zusätzlichen ThinPreps® bereits eine gut sichtbare Menge. Eine größere Menge wird bei normaler Abarbeitung kaum übersehen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das Testsystem unempfindlich gegen geringfügige ThinPrep®-Kontamination ist. Einschränkend ist hierzu zu bemerken, dass in den Experimenten die eingesetzte Zellzahl entsprechend der zusätzlichen ThinPrep®-Menge erhöht wurde. Ein Testansatz, dem 10 % zusätzliches ThinPrep® hinzugegeben wurde, enthielt demnach 10 % mehr Karzinomzellen. Somit konnte zwar der Einfluss auf die Lysereaktion und die ELISA-Methode getestet werden. Eine Probenverdünnung durch zusätzliches ThinPrep®, wie sie sich möglicherweise unter realen Testbedingungen ergeben kann, ist hierbei nicht berücksichtigt worden.

OncoE6™ Cervical Test

Durch die Anordnung von drei Teststreifen auf einer Testeinheit erlaubt der OncoE6™ Cervical Test die gleichzeitige Messung dreier Proben. Zwar können mehrere Testeinheiten gestaffelt abgearbeitet werden. Mehr als vier Testeinheiten und dementsprechend 12 Proben in einem Durchlauf sind aber mit den zeitlichen Vorgaben des Tests nicht vereinbar. Der Vorgang der Vorbereitung der Proben bis zum Auslesen ihrer Ergebnisse erfordert im Durchschnitt knapp drei Stunden.

DISKUSSION

Für die mikroskopische Interpretation eines Zervixabstrichs benötigen Pathologen im Durchschnitt 4-6 Minuten (Jesdapatarakul et al., 2011). Wird die Bearbeitungszeit auf einzelne Proben aufgeteilt, ist der *recomWell* HPV 16/18/45 mit einer Zeit von drei Minuten pro Probe als produktiver zu bewerten. Die Abarbeitung mittels *OncoE6™* Cervical Test hingegen ist mit 15 Minuten pro Probe weitaus zeitaufwändiger und bietet im Blick auf die Produktivität keinen zeitlichen Vorteil gegenüber der aktuellen Screeningroutine.

5.1.4 DER KOSTENAUFWAND

Für die klinische Untersuchung einschließlich Abnahme und Beurteilung eines Zervixabstrichs sind nach dem einheitlichen Bewertungsmaßstab der gesetzlichen Krankenkassen (EBM) 28,57 € zu veranschlagen. Für Privatpatientinnen können Ärzte mit dem Einzelsatz der Gebührenordnung für Ärzte (GoÄ) für diese Leistungen 36,72 € (Ziffern 27, 1105, 4851) abrechnen. Die Kosten für die HPV-Testung belaufen sich nach EBM auf 18,79 € und nach GoÄ auf 99,09 € (Ziffern 4780, 4783, 4785) nach dem Einzelsatz (Kassenärztliche Bundesvereinigung, 2020; Verband der Privaten Krankenversicherung e.V., 2008). Von Seiten der Herstellerfirma des *recomWell* HPV 16/18/45 konnten zum Zeitpunkt dieser Dissertation keine Angaben zum Preis des Tests gemacht werden. Die Arbor Vita Corporation schätzt die Kosten für den *OncoE6™* Cervical Test auf 15 \$. Die Firma gab aber zu bedenken, dass dieser Preis sich je nach Auftragsvolumen noch ändern könnte. Aufgrund dieser lückenhaften Angaben ist ein Vergleich der gesundheitsökonomischen Parameter mit dem gegenwärtigen Screeningalgorithmus nicht möglich.

5.2 LIMITATIONEN DER ERZIELTEN ERGEBNISSE

Bei einer kritischen Beurteilung fallen einige Aspekte auf, die Schlussfolgerungen aus den vorliegenden Ergebnissen einschränken können. Diese Limitationen betreffen die präanalytische, die analytische und die postanalytische Phase der Diagnostik.

5.2.1 LIMITATIONEN IN DER PRÄANALYTISCHEN PHASE

Beide in dieser Arbeit evaluierten Tests messen erhöhte Mengen an Onkoprotein aus Zervixabstrichen. Überschreitet diese Menge einen festgelegten Wert, so gilt die Probe als positiv und das Ergebnis weist auf eine Dysplasie hin. Vorteilhaft am Ansatz der Tests ist, dass sie Material verwenden, das ohnehin zur zytologischen Diagnostik abgenommen werden muss. Für den Arzt ist damit kein zusätzlicher Arbeitsschritt notwendig. Diesem Vorteil steht, wie auch der Zytologie, ein Nachteil gegenüber. Die Verlässlichkeit des Tests ist nur dann gegeben, wenn Bearbeitungsstandards in der Abstrichgewinnung zuverlässig eingehalten werden. Werden durch ungenügende Sorgfalt zu wenige Zellen abgenommen, so erscheinen weniger Onkoprotein enthaltende Zellen im Test. Da dadurch auch die absolute Menge an messbarem Onkoprotein sinkt, kann es so leicht zu einem falsch negativen Resultat kommen. Bisher lässt keiner der beiden Tests Rückschlüsse auf die eingesetzte Zellzahl zu. Dies macht es zum einen unmöglich zu erkennen, ob genug Zellen im Abstrich vorhanden waren. Zum anderen ist auch keine Relativierung der absoluten Onkoproteinmenge auf eine womöglich zu niedrige Zellzahl möglich. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch diese Limitation kann daher nicht ausgeschlossen werden. Damit leiden Onkoproteintests an den gleichen Schwächen wie der zytologische Abstrich: Unter den beurteilenden Pathologen ist die Entnahme des Probenmaterials als die „Achillesferse der Zervixzytologie“ bekannt (Marquardt, 2011).

DISKUSSION

HPV-Tests, wie der in der vorliegenden Dissertation eingesetzte BD Onclarity™ HPV-Test, begegnen diesem Problem, indem sie neben dem Genmaterial der gesuchten HPV-Typen auch die DNA des β -Globins messen (Becton Dickinson and Company, 2019). Als sogenanntes „housekeeping gene“ besitzen alle Zellen das β -Globin-Gen unabhängig von Zelltyp und von äußeren Einflüssen (Saha et al., 2014). Proben mit einem zu geringen β -Globin-Wert deuten auf eine geringe Gesamtzellzahl im Abstrich hin. Solche Proben werden von der Analyse ausgeschlossen, um eine höhere diagnostische Sicherheit zu erreichen. Durch diese Zusatzuntersuchung gelingt es dem HPV-Test, die Limitation zu umgehen, die durch eine zu geringe Zellzahl entsteht.

Die Herstellerfirma des *recomWell* HPV 16/18/45 hat das Problem der fehlenden Zellzahlkontrolle ebenso erkannt. Sie versucht dieses Problem ebenfalls durch eine Zusatzuntersuchung zu lösen. Dem Vernehmen nach arbeiten die Entwickler an einer Version des Tests, die dem Onkoproteintest einen Co-Test zur Seite stellt. Der 2018 in einer Studie der Arbeitsgruppe um Steven McNamara vorgestellte ELISA *recomWell* Keratin 5/8/18 erkennt Keratine vom Typ 5, 8 und 18 (McNamara et al., 2018). Diese Proteine werden sowohl in gesundem als auch in meta- und dysplastischem Zervixepithel exprimiert und eignen sich daher als Positivkontrolle für Zellen aus der Ziellokation des Abstrichs (Ivanyi et al., 1990; Purkis et al., 1990; Smedts et al., 1992). Als interne Kontrolle soll dieser Co-Test eine Sicherheit anbieten, indem er angibt, ob ausreichend Zellen im Abstrich vorhanden waren. Diese Zusatzuntersuchung könnte anzeigen, ob das Ergebnis des *recomWell* HPV 16/18/45 aussagekräftig ist. Die Anzahl der verfälschten Ergebnisse würde dadurch gesenkt und verlässliche diagnostische Aussagen ermöglicht. Zu berücksichtigen ist dabei, dass dieser Zusatztest eine Erhöhung der Arbeitszeit und der Kosten bedeuten würde.

5.2.2 LIMITATIONEN IN DER ANALYTISCHEN PHASE

Die Zervixabstriche aus den unterschiedlichen Kohorten, die in die vorliegende Arbeit eingeflossen sind, wurden in Aliquots aufgeteilt. Aliquots eines Abstriches gingen neben der HPV-Testung und Genotypisierung in die Onkoproteintestung ein. Ebenso wurden Proben, die zu vorbereitenden Messungen wie Scale-Down, ThinPrep®-Rücklauf-Experimente und Washer-Validierung verwendet wurden, zunächst in größerer Menge hergestellt und dann auf einzelne Aliquots aufgeteilt. Bei seiner Verteilung konnte das Probenmaterial allerdings nicht perfekt homogenisiert werden, die Zellen hingen zuweilen in kleinen Komplexen zusammen. Zwar wurden alle Abstriche vor dem Aliquotieren gevortext, sodass mit bloßem Auge keine Zellkomplexe mehr sichtbar waren. Dennoch ist anzunehmen, dass sich diese Verbunde auf mikroskopischer Ebene nicht immer vollständig auflösen ließen. Es ist daher möglich, dass in Aliquots desselben Abstrichs unterschiedlich viele Zellen des normalen und gegebenenfalls des dysplastischen Gewebes vorhanden waren. Im Onkoproteintest eines Aliquots würde damit eine größere absolute Menge von Onkoprotein als im Onkoproteintest des zweiten Aliquots erscheinen. Das könnte zu einem falsch positiven Ergebnis des ersten Aliquots bzw. zu einem falsch negativen Ergebnis des zweiten Aliquots führen. Alle Proben, die in die vorliegende Analyse eingeflossen sind, wurden jedoch gemäß den vorgegebenen Testprotokollen verarbeitet. Es ist zu vermuten, dass die Testsysteme für Schwankungen, die innerhalb der im Protokoll vorgegebenen Regeln auftreten, unempfindlich sind. Damit dürfte eine Situation erreicht sein, die Verfälschungen weitgehend ausschließt. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Korrelationsuntersuchungen: Korreliert man für die einzelnen Proben die Linienintensität des OncoE6™ Cervical Tests mit dem zugrundeliegenden Dysplasiegrad, so zeigt sich eine relevante moderate positive Korrelation ($r_s = 0,345$; $p = 0,01$). Die Korrelation des *recomWell* HPV 16/18/45 ist zwar weniger stark, jedoch ebenfalls relevant ($r_s = 0,151$; $p = 0,05$). Dies lässt darauf schließen, dass das Testsystem generell wenig empfindlich gegen Schwankungen dieser Art ist.

5.2.3 LIMITATIONEN IN DER POSTANALYTISCHEN PHASE

In der postanalytischen Phase ist zu berücksichtigen, dass die getesteten Kohorten nur eingeschränkt auf eine Primärscreeningpopulation zu übertragen sind. Zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden die Testergebnisse auf die Ergebnisse der pathohistologischen Beurteilung bezogen. In der Referral-Kohorte wurden Patientinnen eines Überweisungszentrums eingeschlossen, das auf die Behandlung von Zervixdysplasien spezialisiert ist. Die Prävalenz von Dysplasien ist daher in dieser Gruppe wesentlich höher als in der Allgemeinbevölkerung, ein Umstand, der die Ergebnisse verzerrt. Aufgrund dieses Selektionsbias können nur eingeschränkt Aussagen für die Rolle der Tests in einer Screeningkohorte getroffen werden.

Die griechische Greco-Self-Studie (Agorastos et al., 2019), deren Patientinnen in die Screeningkohorte dieser Dissertation eingingen, untersuchte zwar einen Populationsquerschnitt. Es wurden Patientinnen zwischen 18 und 75 Jahren eingeschlossen, wobei deren Rekrutierung auf einem landesweiten Netzwerk von Gesundheitsdienstleistern basierte. Doch die Ergebnisse dieser Untersuchungsgruppe sind nur eingeschränkt auf die Allgemeinbevölkerung übertragbar. Zum einen sind die Patientinnen, die die Screeningkohorte der vorliegenden Dissertation darstellen, aus einer ursprünglichen Screeningpopulation der Greco-Self-Studie selektioniert worden. Für die Testung wurden lediglich Patientinnen, die mit bestimmten HPV-Typen infiziert waren, ausgewählt. Patientinnen, die HPV-negativ waren oder mit einem anderen HPV-Typ als 16, 18 oder 45 infiziert waren, wurden nicht in die Testung aufgenommen. Es ist zum anderen anzuzweifeln, ob die Klassifizierung von Patientinnen, die ein unauffälliges Kolposkopieergebnis erhalten haben, unter der Rubrik „ohne Dysplasie“ tatsächlich korrekt ist. Der negativ prädiktive Wert der Kolposkopie liegt gemäß Studien zwischen 87,9 und 99,0 % (Nocon et al., 2007). Damit ergibt sich ein Wert, der es durchaus zulässt, dass einige der Patientinnen auf Basis ihres Kolposkopieergebnisses als dysplasiefrei eingestuft wurde, während bei dieser Frau aber tatsächlich eine Dysplasie vorlag.

DISKUSSION

Die vorliegende Dissertation ergänzt daher die Auswertung der Screeningkohorte anhand des Kolposkopieergebnisses um eine zweite Analyse. Diese zweite Berechnung legt die histologische Untersuchung einer Gewebeprobe als Goldstandard fest. Es gehen demnach nur Patientinnen mit gesichertem Biopsieergebnis in diese Auswertung ein. Damit besteht einerseits eine höhere Sicherheit bezüglich der tatsächlich vorliegenden Dysplasie. Auf der anderen Seite schließt die zweite Analyse (n = 33) durch diesen Schritt beinahe die Hälfte der Patientinnen der ersten Auswertung (n = 64) aus. Unter den ausgeschlossenen Patientinnen befinden sich lediglich Patientinnen, die als kolposkopisch unauffällig und damit in der Gesamtwertung als dysplasiefrei beurteilt worden waren. Auf die ursprüngliche Population bezogen werden auf mehreren Stufen vermeintlich krankheitsfreie Patientinnen aus der Bewertung herausgenommen. Die verbleibenden Patientinnen können dadurch kaum mehr die Eigenschaften einer Screeningpopulation widerspiegeln, welche einen hohen Anteil gesunder Patientinnen enthält. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse für die Allgemeinbevölkerung ist daher nur als sehr eingeschränkt zu bewerten.

5.3 VERGLEICH MIT ÄHNLICHEN STUDIEN

Bei den beiden in der vorliegenden Dissertation untersuchten Onkoproteintests handelt es sich um sehr neue diagnostische Verfahren. Zu jedem der beiden Onkoproteintests gibt es einzelne mit den vorliegenden Untersuchungen vergleichbaren Studien, deren Ergebnisse mit den in dieser Dissertation erzielten Ergebnissen abgeglichen werden können. Die Autoren um Agorastos et al. wendeten den *recomWell* HPV 16/18/45 in ihrer 2017 erschienenen Studie an (Agorastos et al., 2017). Zhao et al. untersuchten die Aussagekraft des OncoE6™ Cervical Tests und veröffentlichten ihre Ergebnisse im Jahr 2013 (Zhao et al., 2013).

5.3.1 VERGLEICH DER ERGEBNISSE DES *RECOMWELL* HPV 16/18/45 MIT ERGEBNISSEN ANDERER STUDIEN

Die Arbeitsgruppe um Agorastos et al. setzten den *recomWell* HPV 16/18/45 an einer Screeningkohorte von 1.500 Patientinnen ein. Wie in der vorliegenden Arbeit nahmen die Autoren die Problematik zum Ausgangspunkt ihrer Überlegungen, die sich aus der begrenzten Spezifität des HPV-Tests ergibt. Daher wurde in dieser Studie der Stellenwert des *recomWell* HPV 16/18/45 als Triage-Test evaluiert: Bei allen Teilnehmerinnen wurde zunächst ein zytologischer Abstrich genommen. Dieser wurde für die zytologische Untersuchung, die HPV-Testung sowie die Onkoproteintestung mit dem *recomWell* HPV 16/18/45 verwendet. War die zytologische Untersuchung auffällig oder lag ein „high-risk“-HPV-Typ vor (Prätest positiv), so wurden die Frauen unabhängig vom Ergebnis des Onkoproteintests zur Kolposkopie überwiesen. Zeigte die Kolposkopie ein dysplasieverdächtiges Ergebnis, wurde eine Biopsie entnommen und diese histologisch aufgearbeitet. War die Kolposkopie unauffällig, betrachteten die Autoren die Patientin als dysplasiefrei. Eine Biopsie erfolgte in diesen Fällen nicht. In der Gesamtauswertung wurde das Ergebnis des Onkoproteintests jedoch berücksichtigt und solche Patientinnen genauer untersucht, die auch in diesem Test auffällig waren. Dabei zeigt sich, dass unter den Patientinnen, die eine HPV-16- oder HPV-18-Infektion sowie einen positiven Onkoproteintest aufwiesen, sämtliche Patientinnen waren, bei denen histologisch höhergradige Auffälligkeiten (CIN2+) vorlagen (Sensitivität: 100 %, Spezifität: 49,2 %). Zeigten die Patientinnen eine Infektion mit HPV 16 bzw. HPV 18 sowie einem zusätzlichen „high-risk“-HPV-Typen, so waren Sensitivität und Spezifität ähnlich hoch (Sensitivität: 100 %, Spezifität: 52,1 %).

DISKUSSION

Diese Ergebnisse erlauben die Erwartung, eine kombinierte Anwendung von Zytologie und Onkoproteintest könnte entscheidende Vorteile bringen. Würde der *recomWell* HPV 16/18/45 der Kolposkopie vorgeschaltet und nur die auch in diesem Test auffälligen Patientinnen kolposkopiert, könnten damit sämtliche Patientinnen mit Dysplasie erkannt werden. Gleichzeitig könnte ein großer Teil der Patientinnen, bei denen keine Dysplasie vorlag, durch Triage vor der potentiellen psychischen Belastung einer Abklärungsuntersuchung bewahrt werden. Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Agorastos et al. zeigen auf, dass sich die Erwartungen bestätigen lassen: Die Zahl der Kolposkopien, die notwendig waren, um eine Dysplasie vom Grad CIN2+ zu entdecken, war mit der Onkoproteintest-Triage um 43,8 % niedriger als ohne Zwischenschaltung des Tests (Agorastos et al., 2017).

Die Studie verwies gleichwohl auf verbleibende Einschränkungen. Als relevante Limitation führen die Autoren an, dass histologisch gesicherte Ergebnisse nur für jene Probandinnen vorlagen, die in der Kolposkopie auffällige Befunde zeigten. Dieser Umstand kann zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen. Denn da die Kolposkopie nicht alle Dysplasien identifizieren kann (Sensitivität für CIN2+ von 85 %, Spezifität 69 % nach Kühn und Giesecking, 2015), stuft dieses Verfahren möglicherweise Patientinnen mit Krebsvorstufe fälschlich als dysplasiefrei ein. Eine Verzerrung der Ergebnisse des *recomWell* HPV 16/18/45 kann dann auftreten, wenn eine Dysplasie in der kolposkopischen Untersuchung unerkannt bleibt, im Onkoproteintest hingegen detektiert wird. Obwohl der *recomWell* HPV 16/18/45 diese Patientin als richtig positiv erkannt hat, geht dieser Erkenntnisgewinn zulasten der Spezifität. Denn im Referenztest gilt diese Patientin bei dieser Testbewertung als dysplasiefrei. Anders verhält es sich, wenn eine Dysplasie sowohl im Onkoproteintest als auch in der Kolposkopie unentdeckt bleibt. Trotz des falsch negativen Ergebnisses des Onkoproteintests vermindert sich dessen Sensitivität nicht, da auch der als Referenztest die Patientin nicht erkannt hat. Die tatsächliche Sensitivität des *recomWell* HPV 16/18/45 würde dadurch zu hoch und die Spezifität zu niedrig eingeschätzt werden, was als partieller Verifikationsbias bezeichnet wird (Agorastos et al., 2017).

DISKUSSION

Die Ergebnisse der Screeningkohorte der vorliegenden Arbeit legen einen Vergleich mit der Studie um Agorastos et al. nahe, da die Einschlusskriterien für Patientinnen ähnlich waren. In der Screeningkohorte lagen Biopsieergebnisse nur für solche Patientinnen vor, die in der Kolposkopie auffällige Befunde aufwiesen. In zwei getrennten Analysen wurden Sensitivität und Spezifität zunächst für alle Patientinnen der Kohorte sowie nachfolgend nur für Patientinnen mit gesicherter Histologie berechnet.

Die erste Analyse gleicht damit der Berechnung der Autoren um Agorastos et al.: War eine Patientin in der Kolposkopie unauffällig, so wurde sie fortan als dysplasiefrei klassifiziert. Unter diesem Ansatz erweist sich die Sensitivität für Dysplasien vom Grad CIN2+ als um 50,0 % niedriger als in der Studie nach Agorastos et al., in der alle Dysplasien dieses Grades erkannt wurden (Sensitivität 100 %). Gleichzeitig stellte die Analyse eine Spezifität von 77,1 % fest, welche dem Wert der Arbeitsgruppe um Agorastos et al. (Spezifität 49,2 %) deutlich überlegen ist. Die erhebliche Abweichung der Sensitivität und Spezifität ist hierbei mit dem gänzlich anderen Studiendesign zu erklären.

Die zweite Analyse legte die Histologie als Goldstandard der Auswertung fest. Histologisch gesicherte Ergebnisse lagen nur für Patientinnen vor, deren kolposkopische Untersuchung auffällig war. Patientinnen mit unauffälliger Kolposkopie wurden nicht biopsiert und von der zweiten Analyse ausgeschlossen. Die Sensitivität und damit der Anteil der richtig als krank Erkannten (Anzahl der im *recomWell* HPV 16/18/45 positiven Patientinnen mit Dysplasie) von allen Kranken (Anzahl der Patientinnen mit Dysplasie) bleibt von der für die zweite Analyse getroffenen Selektion unbeeinflusst. Daher ist die Sensitivität für Dysplasien gleich dem Wert aus der ersten Analyse (Sensitivität für Dysplasien vom Grad CIN2+ von 50,0 %, Sensitivität für Dysplasien vom Grad CIN3+ von 37,5 %). Die Spezifität ist im Vergleich zur ersten Analyse damit niedriger (Spezifität für CIN2+ 76,5 %, Spezifität für CIN3+ 64,0 %).

DISKUSSION

Liegt in den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Agorastos et al. eine bedenkliche Ungewissheit hinsichtlich der zugrundeliegenden Dysplasie vor, so versucht diese Dissertation an den Grenzen der 2017 veröffentlichten Studie weiterzuforschen: Sie arbeitet mit einer Kohorte, bei der der Dysplasiestatus sämtlicher Patientinnen abgeklärt ist. Daher besteht nicht die Gefahr, dass die diagnostische Wertigkeit des Tests verzerrt wird. Tatsächlich zeigt sich dadurch eine wesentlich geringere Sensitivität des *recomWell* HPV 16/18/45 für Dysplasien des Grades CIN2+ (Sensitivität: 31,0 %, Spezifität: 79,3 %). Für eine Triage ist es nicht sinnvoll, dem Screeningtest (HPV-Test) einen Test mit geringerer Sensitivität nachzuschalten. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge würden auf diese Weise 69 % der Patientinnen mit Dysplasie vom Grad CIN2+ keiner weiteren Diagnostik zugeführt werden.

5.3.2 VERGLEICH DER ERGEBNISSE DES ONCOE6™ CERVICAL TESTS MIT ERGEBNISSEN ANDERER STUDIEN

Anders verhält es sich mit der Studie der Arbeitsgruppe um Zhao et al. aus dem Jahr 2013. Diese Studie evaluierte die Aussagekraft des OncoE6™ Cervical Tests. Es wurden über 7.500 Teilnehmerinnen eingeschlossen, von denen jede neben einem Zervixabstrich eine visuelle Inspektion der Zervix (VIA) erhielt. Aus dem Zervixabstrich wurden verschiedene HPV-DNA Tests sowie der OncoE6™ Cervical Test durchgeführt. War das Ergebnis einer der Untersuchungen auffällig, so schloss sich eine eingehende kolposkopische Untersuchung an. Entdeckte man dabei dysplasieverdächtige Areale, wurde eine Biopsie entnommen und diese histologisch aufgearbeitet. Der OncoE6™ Cervical Test erkannte Dysplasien vom Grad CIN2+ mit einer Sensitivität von 42,4 % bei einer Spezifität von 99,1 %. Die Sensitivität für Dysplasien vom Grad CIN3+ wurde mit 53,5 % bei einer Spezifität von 98,9 % angegeben (Zhao et al., 2013). Wie die Gruppe um Agorastos et al. relativieren die Autoren um Zhao et al. ihre Ergebnisse, indem sie anmerken, dass durch einen Verifikationsbias die Sensitivität des Tests unter Umständen zu hoch eingeschätzt worden sei.

DISKUSSION

Das Forschungsdesign der vorliegenden Dissertation zielt genau auf diese offene Frage. Es untersucht anhand der Referral-Kohorte eine Gruppe, in der der zugrundeliegende histologische Status aller Patientinnen gesichert war. Daher bestand in der vorliegenden Analyse nicht die Gefahr einer Verzerrung der Sensitivität. Die Sensitivität des OncoE6™ Cervical Tests ist in der Referral-Kohorte höher als die in der Studie von Zhao et al. (Sensitivität für Dysplasien vom Grad CIN2+ von 70,7 % bei einer Spezifität von 67,1 %; Sensitivität für Dysplasien vom Grad CIN3+ von 79,3 % bei einer Spezifität von 48,9 %). Diese Befürchtung der Autoren um Zhao et al. kann auf der Basis der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nicht bestätigt werden. Im Gegenteil liegt die Sensitivität des OncoE6™ Cervical Tests für Dysplasien vom Grad CIN2+ im vorliegenden Kollektiv höher als in der von Zhao et al. untersuchten Gruppe.

In einer gesonderten Analyse teilten Zhao et al. Dysplasien nach zugrundeliegendem HPV-Typ auf und berechneten die Sensitivität und Spezifität für HPV-16-positive bzw. HPV-18-positive Dysplasien getrennt. Es zeigt sich dabei keine höhere Sensitivität für Dysplasien, denen der HPV-Typ 18 zugrunde liegt, wie es in der vorliegenden Dissertation zu beobachten ist (Zhao et al., 2013). Die Untersuchungen an der Referral-Kohorte zeigen eine um 16,3 Prozentpunkte höhere Sensitivität für HPV-18-positive Dysplasien (n = 58) gegenüber HPV-16-positiven Dysplasien (n = 244). Ein möglicher Grund für diese abweichenden Beobachtungen ist die niedrige Zahl HPV-18-positiver Dysplasien, die in der Studie um Zhao et al. vorlag (n = 5). Auf der Grundlage derart geringer Probenzahlen sind kaum zuverlässige Beurteilungen zu treffen.

5.4 ABSCHLIESSENDE BEURTEILUNG UND AUSBLICK

In der Planung eines Screeningprogramms müssen der erwartete Nutzen der Krankheitserkennung und der gegebenenfalls begleitende Schaden einer falsch positiven Diagnose gegeneinander abgewogen werden. Im Jahr 2020 wurde das gesetzliche Gebärmutterhalskrebs-Screening in Deutschland novelliert. Mit dem HPV-Test wurde ein Test mit einer besonders hohen Sensitivität für die krebsverursachende Virusinfektion eingeführt. Da dieser Test auch transiente nicht-karzinogene Infektionen nachweist, erfahren Patientinnen mit einem harmlosen benignen Befund, eine Einordnung als „krebsgefährdet“. Die dadurch entstehende unnötige psychische Belastung ist offensichtlich (McCaffery et al., 2006; O'Connor et al., 2014).

DISKUSSION

Die vorliegende Dissertation widmete sich der Frage, ob Onkoproteintests als Alternative zum HPV-Test oder als Triage-Test dienen und damit die psychische Belastung der Frauen reduzieren können. Zudem könnten durch diesen zusätzlichen Test die Überweisungen zur aufwändigen Kolposkopie verringert werden. Um eine Alternative zum HPV-Test darstellen zu können, müssten die Tests eine diagnostische Wertigkeit aufweisen, die dem HPV-Test zumindest nicht unterlegen ist. Eine sinnvolle Triage bestünde etwa darin, dass einem besonders sensitiven und mäßig spezifischen Test (Screeningtest) ein zweiter Test (Triage-Test) nachgeschaltet wird. Dieser Triage-Test wäre idealerweise ähnlich sensitiv wie der erste, hätte jedoch eine höhere Spezifität. So könnte ein Großteil der tatsächlich Kranken erkannt werden. Falsch positive Ergebnisse für Gesunde könnten hingegen vermindert werden. Ein hoher Arbeits- sowie Kostenaufwand für den nachgeschalteten Test erscheint unter diesen Umständen eher vertretbar, da dieser zweite Test ohnehin nur noch für eine kleinere Gruppe von Patienten eingesetzt werden würde.

Die in dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse lassen keine Empfehlung der beiden untersuchten Onkoproteintests für das Gebärmutterhalskrebscreening in Deutschland zu. Eine niedrige Sensitivität, wie der *recomWell* HPV 16/18/45 sie bietet, disqualifiziert den Test sowohl als Screeningtest wie auch als Triage-Test. Der *OncoE6™* Cervical Test ist zwar sensitiver, dem aktuellen Screeningalgorithmus jedoch als Screeningtest unterlegen. Da Sensitivität und Spezifität dieses Tests gering sind, scheint auch eine Triage mit diesem Test wenig empfehlenswert. Zudem schränkt das auf zwei Typen limitierte HPV-Spektrum des Tests die Aussagekraft für Dysplasien, die durch jegliche HPV-Genotypen hervorgerufen wurden, stark ein.

DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten an, dass der diagnostische Wert beider Onkoproteintests beschränkt ist. Damit soll den Tests jedoch nicht jeder Wert abgesprochen sein. So ist etwa gut vorstellbar, dass diese Tests sich weniger im diagnostischen, so doch im prognostischen Bereich bewähren. Geht man nämlich davon aus, dass die Tests die HPV-Onkoproteinexpression aussagekräftig widerspiegeln, kann vermutet werden, dass die Tests vor allem progrediente Dysplasien als positiv erkennen. Dysplasien, die sich wahrscheinlicher zum Karzinom entwickeln, produzieren eine größere Menge an Onkoprotein (Melsheimer et al., 2004). Sollte sich herausstellen, dass die Tests in der Lage sind, diese Dysplasien von solchen unterscheiden, die folgenlos ausheilen, wäre dies eine Zusatzinformation mit Nutzen für eine Therapieentscheidung. Dass beide in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tests diese Fähigkeit besitzen, dürfte hingegen wenig wahrscheinlich sein. Denn unter den in dieser Studie angelegten Bedingungen liefern sie in nur 53,6 % der Fälle eine übereinstimmende Aussage. Dieser Wert zeigt deutlich an, dass die prognostische Qualität mindestens eines Tests sehr begrenzt ist. Denkbar wäre an dieser Stelle, dass durch eine Kombination der Tests progrediente Dysplasien erkannt werden können. In 22,4 % zeigen die Tests ein übereinstimmend positives Ergebnis. Angesichts einer Progredienzwahrscheinlichkeit von annähernd 31 % kann vermutet werden, dass ein konkordant positives Ergebnis auf eine Dysplasie mit Progressionsneigung hindeutet (McCredie et al., 2008). Folgestudien sollten an dieser Stelle ansetzen und sich um eine weitere Klärung bemühen. Dabei wäre zu untersuchen, ob einer der beiden oder die Kombination der Tests den Anforderungen für einen prognostischen Einsatz genügt.

Entsprechende Untersuchungen können sich auf Vorarbeiten stützen. So konnte etwa die Arbeitsgruppe um Yu et al. 2016 zeigen, dass Patientinnen, die positiv im OncoE6™ Cervical Test getestet wurden, ein hohes Risiko für eine persistierende HPV-Infektion nach 3 Jahren haben (Yu et al., 2016). Dass dieser Zusammenhang auch mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Dysplasie einhergeht, legten Zhang et al. im Jahr 2017 dar. Ein positives Ergebnis im OncoE6™ Cervical Test war in ihrer Studie mit einer kumulativen Zehn-Jahres- Inzidenz von 53 % für Dysplasien vom Grad CIN3+ assoziiert. Lag hingegen ein negatives Ergebnis im OncoE6™ Cervical Test vor, bildete sich die Dysplasie wesentlich häufiger zurück (Zhang et al., 2017).

DISKUSSION

Um die mögliche prognostische Wertigkeit der Onkoproteintests anhand der vorliegenden Dissertation zu überprüfen, bedarf es einer Follow-up-Studie. In dieser sollten die in den jeweiligen Onkoproteintests negativ getesteten Patientinnen nach einem Zeitraum von zwei bis drei Jahren erneut auf eine Dysplasie untersucht werden. Sinnvoll wäre es daher, die prognostische Wertigkeit der Onkoproteintests weiter auszuloten und dabei die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einfließen zu lassen.

LITERATURVERZEICHNIS

Adam, E., Rawls, W.E. und Melnick, J.L. (1974). The association of herpesvirus type 2 infection and cervical cancer. *Prev Med* 3, 122-141.

Agorastos, T., Chatzistamatiou, K., Moysiadis, T., Kaufmann, A.M., Skenderi, A., Lekka, I., Koch, I., Soutschek, E., Boecher, O., Kilintzis, V., Angelidou, S., Katsiki, E., Hagemann, I., Boschetti Gruetzmacher, E., Tsertanidou, A., Angelis, L., Maglaveras, N., Jansen-Duerr, P. (2017). Human papillomavirus E7 protein detection as a method of triage to colposcopy of HPV positive women, in comparison to genotyping and cytology. Final results of the PIPAVIR study. *Int J Cancer* 141, 519-530.

Agorastos, T., Chatzistamatiou, K., Tsertanidou, A., Mouchtaropoulou, E., Pasentsis, K., Kitsou, A., Moysiadis, T., Moschaki, V., Skenderi, A., Katsiki, E., Aggelidou, S., Venizelos, I., Ntoula, M., Daponte, A., Vanakara, P., Garas, A., Stefanos, T., Vrekoussis, T., Lymberis, V., Kontomanolis, E.N., Makrigiannakis, A., Manidakis, G., Deligeoroglou, E., Panoskaltsis, T., Decavalas, G.O., Michail, G., Kalogiannidis, I., Koukoulis, G., Zempili, P., Halatsi, D., Truva, T., Piha, V., Agelena, G., Chronopoulou, A., Vaitisi, V., Chatzaki, E., Paschopoulos, M., Adonakis, G., Kaufmann, A.M., Hadzidimitriou, A. und Stamatopoulos, K. (2019). Implementation of HPV-based Cervical Cancer Screening Combined with Self-sampling Using a Midwifery Network Across Rural Greece: The GRECOSELF Study. *Cancer Prev Res (Phila)* 12, 701-710.

Ahdieh, L., Munoz, A., Vlahov, D., Trimble, C.L., Timpson, L.A. und Shah, K. (2000). Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *Am J Epidemiol* 151, 1148-1157.

Alemaný, L., Cubilla, A., Halec, G., Kasamatsu, E., Quiros, B., Masferrer, E., Tous, S., Lloveras, B., Hernandez-Suarez, G., Lonsdale, R., Tinoco, L., Alejo, M., Alvarado-Cabrero, I., Laco, J., Guimera, N., Poblet, E., Lombardi, L.E., Bergeron, C., Clavero, O., Shin, H.R., Ferrera, A., Felix, A., Germar, J., Mandys, V., Clavel, C., Tzardi, M., Pons, L.E., Wain, V., Cruz, E., Molina, C., Mota, J.D., Jach, R., Velasco, J., Carrilho, C., Lopez-Revilla, R., Goodman, M.T., Quint, W.G., Castellsague, X., Bravo, I., Pawlita, M., Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S. und Hpv Vvap study group. (2016). Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *Eur Urol* 69, 953-961.

Alemaný, L., Saunier, M., Alvarado-Cabrero, I., Quiros, B., Salmeron, J., Shin, H.R., Pirog, E.C., Guimera, N., Hernandez-Suarez, G., Felix, A., Clavero, O., Lloveras, B., Kasamatsu, E., Goodman, M.T., Hernandez, B.Y., Laco, J., Tinoco, L., Geraets, D.T., Lynch, C.F., Mandys, V., Poljak, M., Jach, R., Verge, J., Clavel, C., Ndiaye, C., Klaustermeier, J., Cubilla, A., Castellsague, X., Bravo, I.G., Pawlita, M., Quint, W.G., Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S. und Hpv Vvap study group (2015). Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer* 136, 98-107.

LITERATURVERZEICHNIS

Alemaný, L., Saunier, M., Tinoco, L., Quiros, B., Alvarado-Cabrero, I., Alejo, M., Joura, E.A., Maldonado, P., Klaustermeier, J., Salmeron, J., Bergeron, C., Petry, K.U., Guimera, N., Clavero, O., Murillo, R., Clavel, C., Wain, V., Geraets, D.T., Jach, R., Cross, P., Carrilho, C., Molina, C., Shin, H.R., Mandys, V., Nowakowski, A.M., Vidal, A., Lombardi, L., Kitchener, H., Sica, A.R., Magana-Leon, C., Pawlita, M., Quint, W., Bravo, I.G., Munoz, N., de Sanjose, S., Bosch, F.X. und Hpv Vvap study group (2014). Large contribution of human papillomavirus in vaginal neoplastic lesions: a worldwide study in 597 samples. *Eur J Cancer* 50, 2846-2854.

Arbor Vita Corporation (2019). Onco E6™ Cervical Test, Quick Guide for PreservCyt® Specimen. Verfügbar unter: http://www.arborvita.com/wp-content/uploads/2016/04/OncoE6-Cervical-Test_Quick-Guide.pdf. Letzter Zugriff: 04.09.2019 (19:28 Uhr).

Au Yeung, C.L., Tsang, W.P., Tsang, T.Y., Co, N.N., Yau, P.L. und Kwok, T.T. (2010). HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol Rep* 24, 1599-1604.

Aubin, F., Pretet, J.L., Jacquard, A.C., Saunier, M., Carcopino, X., Jaroud, F., Pradat, P., Soubeyrand, B., Leocmach, Y., Mougin, C., Riethmuller, D. und E. DiTH Study Group (2008). Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: a Large French National Study (EDiTH IV). *Clin Infect Dis* 47, 610-615.

Avci, G.A. (2012). Genomic Organization and Proteins of Human Papillomavirus. Verfügbar unter: http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/2012-03/html/2012-46-3-507-515.html Letzter Zugriff: 22.08.2019 (16:57 Uhr).

Aviles, N.B. (2015). The little death: Rigoni-Stern and the problem of sex and cancer in 20th-century biomedical research. *Social studies of science* 45, 394-415.

Avvakumov, N., Torchia, J. und Mymryk, J.S. (2003). Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene* 22, 3833-3841.

Becton Dickinson and Company (2019). BD Onclarity™ HPV-Test-Benutzerhandbuch. Verfügbar unter: <https://legacy.bd.com/resource.aspx?IDX=36006> Letzter Zugriff: 02.12.2021 (08:03 Uhr).

Brandsma, J.L., Sun, Y., Lizardi, P.M., Tuck, D.P., Zelterman, D., Haines, G.K., 3rd, Martel, M., Harigopal, M., Schofield, K. und Neapolitano, M. (2009). Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology* 389, 100-107.

Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J. und Kouzarides, T. (1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* 18, 2449-2458.

Bubendorfer, L., Feichter, G.E., Obermann, E. und Dalquen, P. (2011). *Pathologie, Zytopathologie, Vol 3* (Berlin, Heidelberg: Springer).

LITERATURVERZEICHNIS

Bujan Rivera, J. und Klug, S.J. (2018). Gebärmutterhalskrebscreening in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 61, 1528-1535.

Bundesgesundheitsministerium (2019). Weiterentwicklung der Gebärmutterhals-Krebsfrüherkennung. Nationaler Krebsplan: Ziel 2a. Verfügbar unter: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/nationaler-krebsplan/was-haben-wir-bisher-erreicht/ziel-2a.html> Letzter Zugriff 02.12.2022 (21:44 Uhr).

Burgers, W.A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T. und Fuks, F. (2007). Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. Oncogene 26, 1650-1655.

Castellsague, X., Alemany, L., Quer, M., Halc, G., Quiros, B., Tous, S., Clavero, O., Alos, L., Biegner, T., Szafarowski, T. Alejo, M., Holzinger, D., Cadena, E., Claros, E., Hall, G., Laco, J., Poljak, M., Benevolo, M., Kasamatsu, E., Mehanna, H., Ndiaye, C., Guimera, N., Lloveras, B., Leon, X., Ruiz-Cabezas, J.C., Alvarado-Cabrero, I., Kang, C.S., Oh, J.K., Garcia-Rojo, M., Iljazovic, E., Ajayi, O.F., Duarte, F., Nessa, A., Tinoco, L., Duran-Padilla, M.A., Pirog, E.C., Viarheichyk, H., Morales, H., Costes, V., Felix, A., Germar, M.J., Mena, M., Ruacan, A., Jain, A., Mehrotra, R., Goodman, M.T., Lombardi, L.E., Ferrera, A., Malami, S., Albanesi, E.I., Dabed, P., Molina, C., Lopez-Revilla, R., Mandys, V., Gonzalez, M.E., Velasco, J., Bravo, I.G., Quint, W., Pawlita, M., Munoz, N., de Sanjose, S., Xavier Bosch, F. und ICO International HPV in Head and Neck Cancer Study Group (2016). HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. Journal of the National Cancer Institute 108, djv403.

Chang, A.R. (1990). Carcinoma in situ of the cervix and its malignant potential. A lesson from New Zealand. Cytopathology 1, 321-328.

Chellappan, S., Kraus, V.B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P.M., Phelps, W.C. und Nevins, J.R. (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 4549-4553.

Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D.C., Murant, T., Broker, T.R. und Chow, L.T. (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. Genes Dev 9, 2335-2349.

Collins, S.I., Constandinou-Williams, C., Wen, K., Young, L.S., Roberts, S., Murray, P.G. und Woodman, C.B. (2009). Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study. Cancer research 69, 3828-3832.

Cuzick, J., Bergeron, C., von Knebel Doeberitz, M., Gravitt, P., Jeronimo, J., Lorincz, A.T., C, J.L.M.M., Sankaranarayanan, R., P, J.F.S. und Szarewski, A. (2012). New technologies and procedures for cervical cancer screening. Vaccine 30 Suppl 5, F107-116.

LITERATURVERZEICHNIS

Davey, E., Barratt, A., Irwig, L., Chan, S.F., Macaskill, P., Mannes, P. und Saville, A.M. (2006). Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet (London, England)* 367, 122-132.

de Sanjose, S., Alemany, L., Ordi, J., Tous, S., Alejo, M., Bigby, S.M., Jaura, E.A., Maldonado, P., Laco, J., Bravo, I.G., Vidal, A., Guimera, N., Cross, P., Wain, G.V., Petry, K.U., Mariani, L., Bergeron, C., Mandys, V., Sica, A.R., Felix, A., Usubutun, A., Seoud, M., Hernandez-Suarez, G., Nowakowski, A.M., Wilson, G., Dalstein, V., Hampl, M., Kasamatsu, E.S., Lombardi, L.E., Tinoco, L., Alvarado-Cabrero, I., Perrotta, M., Bhatla, N., Agorastos, T., Lynch, C.F., Goodman, M.T., Shin, H.R., Viarheichyk, H., Jach, R., Cruz, M.O., Velasco, J., Molina, C., Bornstein, J., Ferrera, A., Domingo, E.J., Chou, C.Y., Banjo, A.F., Castellsague, X., Pawlita, M., Lloveras, B., Quint, W.G., Munoz, N., Bosch, F.X. und Hpv Vvap study group (2013). Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *Eur J Cancer* 49, 3450-3461.

de Sanjose, S., Quint, W.G., Alemany, L., Geraets, D.T., Klaustermeier, J.E., Lloveras, B., Tous, S., Felix, A., Bravo, L.E., Shin, H.R., Vallejos, C.S., de Ruiz, P.A., Lima, M.A., Guimera, N., Clavero, O., Alejo, M., Llombart-Bosch, A., Cheng-Yang, C., Tatti, S.A., Kasamatsu, E., Iljazovic, E., Odida, M., Prado, R., Seoud, M., Grce, M., Usubutun, A., Jain, A., Suarez, G.A., Lombardi, L.E., Banjo, A., Menendez, C., Domingo, E.J., Velasco, J., Nessa, A., Chichareon, S.C., Qiao, Y.L., Lerma, E., Garland, S.M., Sasagawa, T., Ferrera, A., Hammouda, D., Mariani, L., Pelayo, A., Steiner, I., Oliva, E., Meijer, C.J., Al-Jassar, W.F., Cruz, E., Wright, T.C., Puras, A., Llave, C.L., Tzardi, M., Agorastos, T., Garcia-Barriola, V., Clavel, C., Ordi, J., Andujar, M., Castellsague, X., Sanchez, G.I., Nowakowski, A.M., Bornstein, J., Munoz, N., Bosch, F.X. und Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 11, 1048-1056.

de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U. und zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.

Demers, G.W., Halbert, C.L. und Galloway, D.A. (1994). Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology* 198, 169-174.

Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. und Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 25 Suppl 1, 2-23.

Drolet, M., Benard, E., Perez, N., Brisson, M. und Group, HPV Vaccination Impact Study Group. (2019). Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)* 394, 497-509.

Duenas-Gonzalez, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C. und Cervera, E. (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer* 4, 38.

LITERATURVERZEICHNIS

Duensing, S. und **Munger, K.** (2002). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer research* 62, 7075-7082.

Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. und **zur Hausen, H.** (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3812-3815.

Evans, A.S. (1976). Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *Yale J Biol Med* 49, 175-195.

Falcaro, M., Castanon, A., Ndlela, B., Checchi, M., Soldan, K., Lopez-Bernal, J., Elliss-Brookes, L. und **Sasieni, P.** (2021). The effects of the national HPV vaccination programme in England, UK, on cervical cancer and grade 3 cervical intraepithelial neoplasia incidence: a register-based observational study. *Lancet (London, England)* 398, 2084-2092.

Fraumeni, J.F., Jr., Lloyd, J.W., Smith, E.M. und **Wagoner, J.K.** (1969). Cancer mortality among nuns: role of marital status in etiology of neoplastic disease in women. *Journal of the National Cancer Institute* 42, 455-468.

Frazer, I.H. (2009). Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology* 384, 410-414.

Gemeinsamer Bundesausschuss (2018a). Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Krebsfrüherkennungs-Richtlinie und eine Änderung der Richtlinie für organisierte Krebsfrüherkennungsprogramme - Programm zur Früherkennung von Zervixkarzinomen, G. Bundesausschuss, ed. (Berlin).

Gemeinsamer Bundesausschuss (2018b). Gebärmutterhalskrebs- Früherkennung Angebot der gesetzlichen Krankenversicherung - Versicherteninformation für Frauen ab 35 Jahren (Berlin), pp. 5.

Gemeinsamer Bundesausschuss (2018c). Tragende Gründe zum Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Krebsfrüherkennungs-Richtlinie und eine Änderung der Richtlinie für organisierte Krebsfrüherkennungsprogramme: Programm zur Früherkennung von Zervixkarzinomen (Berlin).

Griesser, H., Beinl, H. und **Jordan, B.** (2014). Münchner Nomenklatur III: Gynäkologische Dysplasien werden klar zugeordnet. In *Deutsches Ärzteblatt*, pp. 640.

Hansel, A., Steinbach, D., Greinke, C., Schmitz, M., Eiselt, J., Scheungraber, C., Gajda, M., Hoyer, H., Runnebaum, I.B. und **Durst, M.** (2014). A promising DNA methylation signature for the triage of high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *PLoS One* 9, e91905.

Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R. und **Schiller, J.T.** (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 8, 3905-3910.

LITERATURVERZEICHNIS

Helt, A.M. und Galloway, D.A. (2001). Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J Virol* 75, 6737-6747.

Ho, G.Y., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C.J. und Burk, R.D. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338, 423-428.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2007). Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 90, 1-636.

ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (2019). Germany: Human Papillomavirus and Related Cancers, Fact Sheet 2018, ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer, ed.

International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer (2007). Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer* 120, 885-891.

International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby, P., Beral, V., Berrington de Gonzalez, A., Colin, D., Franceschi, S., Goodhill, A., Green, J., Peto, J., Plummer, M. und Sweetland, S. (2007). Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet (London, England)* 370, 1609-1621.

Isaacson Wechsler, E., Wang, Q., Roberts, I., Pagliarulo, E., Jackson, D., Untersperger, C., Coleman, N., Griffin, H. und Doorbar, J. (2012). Reconstruction of human papillomavirus type 16-mediated early-stage neoplasia implicates E6/E7 deregulation and the loss of contact inhibition in neoplastic progression. *J Virol* 86, 6358-6364.

Ivanyi, D., Groeneveld, E., Van Doornewaard, G., Mooi, W.J. und Hageman, P.C. (1990). Keratin subtypes in carcinomas of the uterine cervix: implications for histogenesis and differential diagnosis. *Cancer research* 50, 5143-5152.

Jeon, S., Allen-Hoffmann, B.L. und Lambert, P.F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69, 2989-2997.

Jeon, S. und Lambert, P.F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1654-1658.

Jesdapatarakul, S., Tangjitgamol, S., Nguansangiam, S. und Manusirivithaya, S. (2011). Liqui-Prep® versus conventional Papanicolaou smear to detect cervical cells abnormality by split-sample technique: a randomized double-blind controlled trial. *Diagn Cytopathol* 39, 22-27.

LITERATURVERZEICHNIS

Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehman, E.D., Sands, J.A., Jansen, K.U. und Keller, P.M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274, 5810-5822.

Kaderli, R., Schnuriger, B. und Brugger, L.E. (2014). The impact of smoking on HPV infection and the development of anogenital warts. *Int J Colorectal Dis* 29, 899-908.

Kassenärztliche Bundesvereinigung (2020). Organisierte Früherkennung von Gebärmutterhalskrebs - Die Leistungen im Überblick. Verfügbar unter: https://www.kbv.de/media/sp/Organisierte_Frueherkennung_Gebaermutterhalskrebs_Leistungsuebersicht.pdf Letzter Zugriff: 17.01.2022 (14:44 Uhr).

Kavanagh, K., Pollock, K.G., Potts, A., Love, J., Cuschieri, K., Cubie, H., Robertson, C. und Donaghy, M. (2014). Introduction and sustained high coverage of the HPV bivalent vaccine leads to a reduction in prevalence of HPV 16/18 and closely related HPV types. *Br J Cancer* 110, 2804-2811.

Khan, M.J., Castle, P.E., Lorincz, A.T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D.R., Rush, B.B., Glass, A.G. und Schiffman, M. (2005a). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 1072-1079.

Khan, M.J., Partridge, E.E., Wang, S.S. und Schiffman, M. (2005b). Socioeconomic status and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer* 104, 61-70.

Kines, R.C., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Schiller, J.T. und Day, P.M. (2009). The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20458-20463.

Kjaer, S.K., Sigurdsson, K., Iversen, O.E., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C.M., Perez, G., Brown, D.R., Koutsky, L.A., Tay, E.H., Garcia, P. und Ault, K.A., Garland, S.M., Leodolter, S., Olsson, S.E., Tang, G.W., Ferris, D.G., Paavonen, J., Lehtinen, M., Steben, M., Bosch, F.X., Dillner, J., Joura, E.A., Majewski, S., Munoz, N., Myers, E.R., Villa, L.L., Taddeo, F.J., Roberts, C., Tadesse, A., Bryan, J., Maansson, R., Lu, S., Vuocolo, S., Hesley, T.M., Saah, A., Barr, E. und Haupt, R.M. (2009). A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 868-878.

Kubbutat, M.H., Jones, S.N. und Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.

Kühn, W. und Giesecking, F. (2015). Empfehlungen der AGCPC zur Kolposkopie, Diagnostik und Therapie bei Erkrankungen des unteren Genitaltraktes der Frau (Arbeitsgemeinschaft für Kolposkopie und Zervixpathologie (AD-CPC)).

LITERATURVERZEICHNIS

Kyrgiou, M., Athanasiou, A., Paraskevaidi, M., Mitra, A., Kalliala, I., Martin-Hirsch, P., Arbyn, M., Bennett, P. und Paraskevaidis, E. (2016). Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 354, i3633.

Leitlinienprogramm Onkologie (2020). (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention des Zervixkarzinoms, Langversion 1.0, 2020, AWMF Registernummer: 015/027OL. Verfügbar unter: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/zervixkarzinom-praevention/> Letzter Zugriff: 17.01.2022 (13:10 Uhr).

Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.

Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P.J. und Clifford, G.M. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 128, 927-935.

Li, T., Wu, Z., Jiang, M., Zhao, Y., Yu, L., Qin, Y., Liu, B., Cui, J., Li, L., Pan, Q., , Zhang, X., Liu, D., Chen, F., Qiao, Y. und Chen, W.. (2020). Clinical performance of Onclarity HPV assay and Cobas HPV test in detection of cervical precancer and cancer in Chinese women. *Gynecol Oncol* 157, 202-208.

Marquardt, K. (2011). Zervixzytologie: Der repräsentative Abstrich. *Der Frauenarzt* 52/2011, 484-488.

McCaffery, K., Waller, J., Nazroo, J. und Wardle, J. (2006). Social and psychological impact of HPV testing in cervical screening: a qualitative study. *Sex Transm Infect* 82, 169-174.

McCredie, M.R., Sharples, K.J., Paul, C., Baranyai, J., Medley, G., Jones, R.W. und Skegg, D.C. (2008). Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 9, 425-434.

McIntyre-Seltman, K., Castle, P.E., Guido, R., Schiffman, M., Wheeler, C.M. und Group, A. (2005). Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 14, 1165-1170.

McNamara, S.A., Kaufmann, A.M., Vasiljeva, J., Drechsler, I., Luyten, A., Petry, K.U., Chatzistamatiou, K., Agorastos, T., Soutschek, E., Boecher, O. und Koch, I. (2018). Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cytokeratins 5, 8, and 18, and its implications in cervical cancer screening standardization. *J Clin Mol Med* 1.

LITERATURVERZEICHNIS

Melsheimer, P., Vinokurova, S., Wentzensen, N., Bastert, G. und von Knebel Doeberitz, M. (2004). 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* 10, 3059-3063.

Mikrogen Diagnostik GmbH (2017). *recomWell HPV 16/18/45* Gebrauchsanweisung. Verfügbar unter: <https://www.mikrogen.de/produkte/produktuebersicht/weitereinfo/hpv-161845.html>
Letzter Zugriff 17.01.2022 (16:57 Uhr).

Moody, C.A. und Laimins, L.A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10, 550-560.

Moscicki, A.B., Shiboski, S., Hills, N.K., Powell, K.J., Jay, N., Hanson, E.N., Miller, S., Canjura-Clayton, K.L., Farhat, S., Broering, J.M. und Darragh, T.M. (2004). Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* (London, England) 364, 1678-1683.

Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. und Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15, 267-285.

Munoz, N., Franceschi, S., Bosetti, C., Moreno, V., Herrero, R., Smith, J.S., Shah, K.V., Meijer, C.J., Bosch, F.X. und International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study, G. (2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* (London, England) 359, 1093-1101.

Naib, Z.M., Nahmias, A.J., Josey, W.E. und Kramer, J.H. (1969). Genital herpetic infection. Association with cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 23, 940-945.

Nanda, K., McCrory, D.C., Myers, E.R., Bastian, L.A., Hasselblad, V., Hickey, J.D. und Matchar, D.B. (2000). Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 132, 810-819.

Nocon, M., Mittendorf, T., Roll, S., Greiner, W. und Willich, S., Graf von der Schulenburg, J-M: (2007). Welchen medizinischen und gesundheitsökonomischen Nutzen hat die Kolposkopie als primäres Screening auf das Zervixkarzinom?, Deutsche Agentur für HTA des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information, ed. (Köln: Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI), pp. 16.

O'Connor, M., Costello, L., Murphy, J., Prendiville, W., Martin, C.M., O'Leary, J.J., Sharp, L. und Irish Screening Research, C. (2014). 'I don't care whether it's HPV or ABC, I just want to know if I have cancer.' Factors influencing women's emotional responses to undergoing human papillomavirus testing in routine management in cervical screening: a qualitative study. *BJOG* 121, 1421-1429.

LITERATURVERZEICHNIS

Park, S.J., Seo, J., Ha, S.H. und Jung, G.W. (2014). Prevalence and determinants of high-risk human papillomavirus infection in male genital warts. *Korean J Urol* 55, 207-212.

Peitsaro, P., Johansson, B. und Syrjanen, S. (2002). Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 40, 886-891.

Peyton, C.L., Gravitt, P.E., Hunt, W.C., Hundley, R.S., Zhao, M., Apple, R.J. und Wheeler, C.M. (2001). Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. *J Infect Dis* 183, 1554-1564.

Pfister, H. (2012). Prophylaxis and Early Detection of HPV-Related Neoplasia, Vol 28 (Köln: Karger).

Pirotta, M., Ung, L., Stein, A., Conway, E.L., Mast, T.C., Fairley, C.K. und Garland, S. (2009). The psychosocial burden of human papillomavirus related disease and screening interventions. *Sex Transm Infect* 85, 508-513.

Purkis, P.E., Steel, J.B., Mackenzie, I.C., Nathrath, W.B., Leigh, I.M. und Lane, E.B. (1990). Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci* 97 (Pt 1), 39-50.

Pyeon, D., Pearce, S.M., Lank, S.M., Ahlquist, P. und Lambert, P.F. (2009). Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 5, e1000318.

Reich, N.C. und Levine, A.J. (1984). Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 308, 199-201.

Rigoni-Stern, D.A. (1842). Fatti statistici relativi alle malattie cancerose che servono di base alle poche cose dette dal Dott. Rigoni-Stern il 23 settembre alla sottosezione di chirurgia al IV Congresso degli Scienziati Italiani. *Giornale per servire ai progressi della patologia e della terapeutica* 2, 499-517.

Robert-Koch-Institut (2019). Empfehlungen der Ständigen Impfkommission beim Robert Koch-Institut – 2019/2020. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health 2019.

Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2006). Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends (Saarbrücken).

Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014 (Berlin), pp. 80-83.

Romanczuk, H. und Howley, P.M. (1992). Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3159-3163.

LITERATURVERZEICHNIS

- Saccucci**, M., Franco, E.L., Ding, L., Bernstein, D.I., Brown, D. und Kahn, J.A. (2018). Non-Vaccine-Type Human Papillomavirus Prevalence After Vaccine Introduction: No Evidence for Type Replacement but Evidence for Cross-Protection. *Sex Transm Dis* 45, 260-265.
- Saha**, D., Patgaonkar, M., Shroff, A., Ayyar, K., Bashir, T. und Reddy, K.V. (2014). Hemoglobin expression in nonerythroid cells: novel or ubiquitous? *Int J Inflam* 2014, 803237.
- Scheffner**, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. und Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- Schiffman**, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C. und Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet (London, England)* 370, 890-907.
- Schiffman**, M. und Wentzensen, N. (2013). Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 22, 553-560.
- Schiller**, J.T., Day, P.M. und Kines, R.C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 118, S12-17.
- Schmitt**, M., Dondog, B., Waterboer, T. und Pawlita, M. (2008). Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* 46, 1050-1059.
- Schwarz**, T.F., Kocken, M., Petaja, T., Einstein, M.H., Spaczynski, M., Louwers, J.A., Pedersen, C., Levin, M., Zahaf, T., Poncelet, S., Hardt, K., Descamps, D. und Dubin, G. (2010). Correlation between levels of human papillomavirus (HPV)-16 and 18 antibodies in serum and cervicovaginal secretions in girls and women vaccinated with the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine. *Hum Vaccin* 6, 1054-1061.
- Scotto**, J. und Bailar, J.C., 3rd (1969). Rigoni-Stern and medical statistics. A nineteenth-century approach to cancer research. *J Hist Med Allied Sci* 24, 65-75.
- Sebastian**, J.A., Leeb, B.O. und See, R. (1978). Cancer of the cervix--a sexually transmitted disease. Cytologic screening in a prostitute population. *American journal of obstetrics and gynecology* 131, 620-623.
- Seedorf**, K., Oltersdorf, T., Krammer, G. und Rowekamp, W. (1987). Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J* 6, 139-144.
- Shah**, K.H., Lewis, M.G., Jenson, A.B., Kurman, R.J. und Lancaster, W.D. (1980). Papillomavirus and cervical dysplasia. *Lancet (London, England)* 2, 1190.
- Sheffield**, M.V., Simsir, A., Talley, L., Roberson, A.J., Elgert, P.A. und Chhieng, D.C. (2003). Interobserver variability in assessing adequacy of the squamous component in conventional cervicovaginal smears. *Am J Clin Pathol* 119, 367-373.

LITERATURVERZEICHNIS

- Shivapurkar**, N., Toyooka, S., Toyooka, K.O., Reddy, J., Miyajima, K., Suzuki, M., Shigematsu, H., Takahashi, T., Parikh, G., Pass, H.I., Chaudhary, P.M., und Gazdar, A.F. (2004). Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. *Int J Cancer* 109, 786-792.
- Siddiq**, A., Broniarczyk, J. und Banks, L. (2018). Papillomaviruses and Endocytic Trafficking. *Int J Mol Sci* 19.
- Siedler A** und Rieck T (2020). Erhebung von Impfquoten im Kindes- und Jugendalter in Deutschland - Die RKI Impfsurveillance und ihr neues Publikationsformat. In *Epid Bull* 2020;32/33:3–8.
- Singh GK**, M.B., Hankey BF, Edwards BK, (2003). Area Socioeconomic Variations in U.S. Cancer Incidence, Mortality, Stage, Treatment, and Survival, 1975–1999. In *NCI Cancer Surveillance Monograph Series, Number 4* (Bethesda, MD), pp. 30-31.
- Smedts**, F., Ramaekers, F., Troyanovsky, S., Pruszczynski, M., Link, M., Lane, B., Leigh, I., Schijf, C. und Vooijs, P. (1992). Keratin expression in cervical cancer. *Am J Pathol* 141, 497-511.
- Smith**, J.S., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer, R. und Clifford, G.M. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 121, 621-632.
- Smotkin**, D., Prokoph, H. und Wettstein, F.O. (1989). Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol* 63, 1441-1447.
- Soderlund-Strand**, A., Uhnoo, I. und Dillner, J. (2014). Change in population prevalences of human papillomavirus after initiation of vaccination: the high-throughput HPV monitoring study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23, 2757-2764.
- Sotlar**, K. (2008). Die Infektion mit humanen Papillomaviren. In *Der Pathologe*, pp. 153-156.
- Stanley**, M. (2010). Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* 117, S5-10.
- Stoler**, M.H., Schiffman, M. und Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study, G. (2001). Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 285, 1500-1505.
- Strickler**, H.D., Burk, R.D., Fazzari, M., Anastos, K., Minkoff, H., Massad, L.S., Hall, C., Bacon, M., Levine, A.M., Watts, D.H., Silverberg, M.J., Xue, X., Schlecht, N.F., Melnick, S. und Palefsky, J.M. (2005). Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 577-586.

LITERATURVERZEICHNIS

Towne, J.E. (1955). Carcinoma of the cervix in nulliparous and celibate women. *American journal of obstetrics and gynecology* 69, 606-613.

Turan, T., Kalantari, M., Calleja-Macias, I.E., Cubie, H.A., Cuschieri, K., Villa, L.L., Skomedal, H., Barrera-Saldana, H.A. und Bernard, H.U. (2006). Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: a biomarker of neoplastic progression? *Virology* 349, 175-183.

Verband der Privaten Krankenversicherung e.V. (2008). Gebührenordnung für Ärzte (GoÄ). Verfügbar unter:

<https://www.derprivatpatient.de/sites/default/files/gebuehrenordnung-fuer-aerzte.pdf>

Letzter Zugriff: 17.01.2022 (17:15 Uhr).

Vercellino, G.F., Erdemoglu, E., Chiantera, V., Vasiljeva, K., Drechsler, I., Cichon, G., Schneider, A. und Bohmer, G. (2013). Validity of the colposcopic criteria inner border sign, ridge sign, and rag sign for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 121, 624-631.

Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J. und Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189, 12-19.

Wentzensen, N. (2016). Epidemiology, prevention and early detection of cervical cancer. *Onkologie (Berl)* 22, 725-736.

Weyerstahl, T., Stauber, M. und Andergassen, U. (2013). Gynäkologie und Geburtshilfe (Thieme, Stuttgart).

Wolf, H., Zur Hausen, H., Klein, G., Becker, V., Henle, G. und Henle, W. (1975). Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors. III. Epstein-Barr viral DNA in non-lymphoid nasopharyngeal carcinoma cells. *Med Microbiol Immunol* 161, 15-21.

Wong, Y.F., Chung, T.K., Cheung, T.H., Nobori, T., Yu, A.L., Yu, J., Batova, A., Lai, K.W. und Chang, A.M. (1999). Methylation of p16INK4A in primary gynecologic malignancy. *Cancer Lett* 136, 231-235.

World Health Organization (2019). Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Verfügbar unter: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer) Letzter Zugriff: 04.07.2019 (18:30 Uhr).

Yu, L.L., Kang, L.N., Zhao, F.H., Lei, X.Q., Qin, Y., Wu, Z.N., Wang, H., Chen, W. und Qiao, Y.L. (2016). Elevated Expression of Human Papillomavirus-16/18 E6 Oncoprotein Associates with Persistence of Viral Infection: A 3-Year Prospective Study in China. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 25, 1167-1174.

Zhang, Q., Dong, L., Hu, S., Feng, R., Zhang, X., Pan, Q., Ma, J., Zhang, L., Zhao, X., Sankaranarayanan, R. Qiao, Y. und Zhao, F. (2017). Risk stratification and long-term risk prediction of E6 oncoprotein in a prospective screening cohort in China. *Int J Cancer* 141, 1110-1119.

LITERATURVERZEICHNIS

Zhao, F.H., Jeronimo, J., Qiao, Y.L., Schweizer, J., Chen, W., Valdez, M., Lu, P., Zhang, X., Kang, L.N., Bansil, P., Paul, P., Mahoney, C., Berard-Bergery, M., Bai, P., Peck, R., Li, J., Chen, F., Stoler, M.H. und Castle, P.E. (2013). An evaluation of novel, lower-cost molecular screening tests for human papillomavirus in rural China. *Cancer Prev Res (Phila)* 6, 938-948.

zur Hausen, H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer research* 36, 794.

zur Hausen, H. (1982). Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet (London, England)* 2, 1370-1372.

zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2, 342-350.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Sophia Ossmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Evaluation von Onkoproteintests als molekulare Triage-Tests im Zervixkarzinomscreening - Evaluation of oncoprotein based tests as molecular triage tests in the cervical cancer screening program“ 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 (siehe Anteilserklärung). 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 StGB) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

LEBENS LAUF

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

DANKSAGUNG

Mein erster ganz herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Dr. Kaufmann. Verständnisvoll und geduldig hat er jede Phase dieser Arbeit unterstützt und war mir ein hervorragender Betreuer. Seine stets geöffnete Tür hat mich ermutigt, auch in schwierigen Situationen die Auseinandersetzung mit den Hintergründen unserer Daten zu suchen. Nicht selten bin ich nach dem Gespräch durch diese Tür hinausgegangen und war voller Elan und neuer Begeisterung für die Arbeit. Seine Faszination für die Wissenschaft hat schon viele angesteckt.

Der Arbor Vita Corporation und der Firma Mikrogen Diagnostik möchte ich ebenso danken. Indem sie ihre Testkits zur Verfügung gestellt und mich in praktischen Fragen unterstützt haben, haben sie sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente möchte ich dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg danken.

Ganz wesentlich haben die Mitglieder des Teams der AG Kaufmann meine Arbeit bereichert, welchen ich ebenso herzlich danken möchte. Durch ihre lehrreichen fachlichen Hinweise und nicht zuletzt ihren Humor habe ich mich auch als Anfängerin im Laborumfeld ab dem ersten Tag wohlgeföhlt.

Danken möchte ich auch meinen Geschwistern, Eva und Benedikt, meinen Freunden, sowie meiner Boxtrainerin Serena. Sie haben mich während der Arbeit an dieser Dissertation häufig aufgeheitert und ich habe keinen Zweifel daran, dass das Ergebnis dadurch deutlich gewonnen hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Cousin Michael. Ihnen möchte ich für die inhaltlichen und formalen Diskussionen und für ihr geduldiges Lektorat bedanken. Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle meinen größten Dank aussprechen: Für ihre Ermutigung und ihre Unterstützung, die diese Dissertation und meine gesamte bisherige Bildung erst ermöglicht haben.

BESCHEINIGUNG DER AKKREDITIERTEN STATISTIKERIN



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

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/>



Name, Vorname: Ossmann, Sophia
Emailadresse: Sophia.ossmann@charite.de
Matrikelnummer: 219006
PromotionsbetreuerIn: Dr. Andreas Kaufmann
Promotionsinstitution / Klinik: Klinik für Gynäkologie

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau *Sophia Ossmann* 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: *09.09.2019*
- Termin 2: *21.11.2019*
- Termin 3: *04.06.2021*

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

- Berechnung Diagnostische Tests (Sensitivität/Spezifität, NPV/PPV)
- Statistische Signifikanz vs klinische Relevanz und der Zusammenhang mit Fallzahlen, Fokus auf die Relevanz, da die Signifikanz durch multiples Testen schwer zu interpretieren ist
- Ein nicht statistisch Signifikantes Ergebnis für einen Test zum Nachweis eines Unterschieds bedeutet nicht Gleichheit (hierfür Äquivalenztest nötig)

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:

Name der Beraterin: Dr. Theresa Keller:



Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

