

DISSERTATION

Detektion zervikaler intraepithelialer Neoplasien anhand
konventioneller HPV-Testung und
mRNA-Biomarker-Quantifizierung durch QuantiGene-
Molecular-Profiling-Histology

Detection of cervical intraepithelial neoplasia based on
conventional HPV testing compared to
mRNA biomarker quantification through QuantiGene-
Molecular-Profiling-Histology Assay

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maximilian Jean-Guillaume Menton

Erstbetreuung: PD Dr. rer. nat. Andreas Kaufmann

Datum der Promotionsabgabe: 29.11.2024

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | 5 |
| Tabellenverzeichnis | 6 |
| Abkürzungsverzeichnis | 7 |
| 1 Einleitung | 11 |
| 1.1 Historischer Hintergrund | 11 |
| 1.2 Epidemiologie des Zervixkarzinoms..... | 12 |
| 1.3 Humanes Papillomvirus – HPV..... | 14 |
| 1.3.1 Aufbau und Klassifikation | 14 |
| 1.3.2 Onkogene Transformation der Zervikalzellen durch HPV | 17 |
| 1.4 Prävention des Zervixkarzinoms | 18 |
| 1.4.1 Primärprävention Impfung..... | 18 |
| 1.4.2 Sekundärprävention Deutschland – neuer Co-Test Algorithmus 2020 | 20 |
| 1.5 Zytologie nach Papanicolaou..... | 21 |
| 1.6 Leitlinienkonforme HPV-Tests | 23 |
| 1.7 Kolposkopische Abklärung & operative Intervention | 27 |
| 1.7.1 Kolposkopie..... | 27 |
| 1.7.2 Konisation und Lasertherapie | 30 |
| 1.8 Biomarker für das Zervixkarzinom und zervikaler Dysplasien im QG-MPH Assay | 30 |
| 1.8.1 Onkoproteine und Splicemarker..... | 31 |
| 1.8.2 Tumorsuppressorgene | 33 |
| 1.8.3 Proliferationsmarker..... | 34 |
| 1.8.4 Marker der „squamocolumnar junction zone“ (SJZ) | 36 |
| 1.8.5 Stammzellmarker..... | 38 |
| 1.8.6 Zellularitätsmarker | 39 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1.9 | Gesundheitsökonomische Aspekte zum Thema Gebärmutterhalskrebscreening | 39 |
| 2 | Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit | 40 |
| 2.1 | Zielsetzung..... | 41 |
| 2.2 | Hypothesen | 41 |
| 3 | Material & Methodik | 42 |
| 3.1 | Studienpopulation & Rekrutierung | 42 |
| 3.2 | Probenkollektiv..... | 43 |
| 3.3 | Angewendete Tests für den HPV-Nachweis | 46 |
| 3.3.1 | QuantiGene-Molecular-Profilig-Histology Assay (QG-MPH) | 46 |
| 3.3.1.1 | QG-MPH Assay – praktische Durchführung | 49 |
| 3.3.1.2 | QG-MPH-Assay – Material, Reagenzien und Geräte..... | 52 |
| 3.3.2 | MPG – Multiplexed Genotyping | 54 |
| 3.3.3 | Seegene Anyplex II HPV (Seegene Inc.)..... | 55 |
| 3.3.4 | BD Onclarity® HPV-Assay (Becton Dickinson and Company Inc.) | 55 |
| 3.3.5 | Aptima® RNA HPV-Assay (Hologic Inc.) | 58 |
| 3.3.6 | Roche Cobas® (Roche Holding AG)..... | 59 |
| 3.4 | HPV-Tests – Vergleich der Parameter | 61 |
| 3.5 | Statistische Auswertung..... | 62 |
| 3.6 | Kostenvergleichsanalyse QG-MPH vs. Co-Testing | 64 |
| 4 | Ergebnisse | 65 |
| 4.1 | Übereinstimmung von HPV-Test und histologischen Befunden | 65 |
| 4.1.1 | QG-MPH Ergebnisse der integrierten HPV-Testung..... | 66 |
| 4.1.2 | BD Onclarity HPV-Test Ergebnisse | 68 |
| 4.1.3 | Hologic Aptima HPV-Test Ergebnisse | 69 |
| 4.1.4 | Roche Cobas HPV-Test Ergebnisse..... | 70 |
| 4.1.5 | Seegene Anyplex-II HPV-Test Ergebnisse..... | 71 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.1.6 | MPG HPV-Test Ergebnisse | 72 |
| 4.1.7 | HPV Gesamtergebnisse Übersicht und Ergebnisse | 73 |
| 4.2 | QG MPH Assay - risk score Auswertung | 74 |
| 4.3 | Kostenvergleichsanalyse QG-MPH vs. Co-Testing | 81 |
| 4.3.1 | Kostenübersicht nach EBM des Co-Testings seit 2020 | 81 |
| 4.3.2 | Kostenaufstellung QG-MPH | 88 |
| 4.3.3 | Vergleich QG-MPH Screening vs. HPV-Zytologie Co-Testing | 91 |
| 5 | Diskussion | 93 |
| 5.1 | Testauswertung HPV Ergebnisse | 96 |
| 5.2 | QG-MPH risk score – besser als konventionelle HPV-Tests? | 97 |
| 5.3 | Kostenanalyse – welches Modell ist volkswirtschaftlich sinnvoll? | 99 |
| 5.4 | Die Pathologie als Goldstandard – ist das weiterhin zeitgemäß? | 101 |
| 5.5 | Limitationen der vorliegenden Arbeit | 101 |
| 5.6 | Zusammenfassung und Ausblick auf die Zukunft des QG-MPH und dem Screening auf Gebärmutterhalskrebs | 102 |
| | Literaturverzeichnis | 103 |
| | Eidesstaatliche Versicherung | 116 |
| | Lebenslauf | 117 |
| | Persönlicher Dank | 119 |
| | Akkreditierung Insitut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) | 121 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1 – Geschätzte altersstandardisierte Mortalität des Zervixkarzinoms..... | 14 |
| Abbildung 2 - Epitom des HPV mit den verschiedenen Codierungsregionen für early (E)- und late (L-) Gensequenzen..... | 15 |
| Abbildung 3 - Papillomvirus aus Hautwarze. Transmissions- Elektronenmikroskopie Negativkontrastierung - 2009 RKI | 17 |
| Abbildung 4 - Stadien der HPV-Infektion..... | 18 |
| Abbildung 5 - Empfehlung zur Verwendung von HPV-Testsystemen im Rahmen des Gebärmutterhalskrebscreenings in Deutschland – AWMF S3-Leitlinie – 2017 | 25 |
| Abbildung 6 - Charakterisierung der Biomarker innerhalb der „squamocolumnar junction zone“ (SJZ) – National Cancer Institute – 2012..... | 37 |
| Abbildung 7 - Funktionsprinzip des QG-MPH Assays | 47 |
| Abbildung 8 - BD Onclarity HPV-Assay | 56 |
| Abbildung 9 - BD Viper LT® System | 57 |
| Abbildung 10– BD COR® | 57 |
| Abbildung 11– Vollautomatisierungssystem HPV-Diagnostik Panther® | 59 |
| Abbildung 12– Virustypen Roche Cobas® | 60 |
| Abbildung 13– Übersicht Vollautomatisation HPV Roche Cobas® | 60 |
| Abbildung 14 - Abklärungsalgorithmus für das Zytologie-Screening für Frauen im Alter von 20-34 Jahren – Gemeinsamer Bundesausschuss - Seite 7 | 84 |
| Abbildung 15 – Abklärungsalgorithmus für das kombinierte Screening für Frauen über 35 Jahren – Quelle Gemeinsamer Bundesausschuss 2020 – Seite 9..... | 85 |
| Abbildung 16 – Receiver operating characteristic (ROC) Analyse der Aussagekraft und Genauigkeit der QG-MPH Risk Scores | 98 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1 - Weltweit HPV-bedingte Tumorinzidenzen | 13 |
| Tabelle 2 - Übersicht HPV-Impfstoffe | 19 |
| Tabelle 3 - Zytologische Nomenklatur München III – gültig ab 01.2015 in Deutschland – AG-CPC..... | 22 |
| Tabelle 4 - Leitlinienkonforme HPV-Testsysteme – AWMF S3-Leitlinie – 2017..... | 26 |
| Tabelle 5 - Kolposkopische Nomenklatur AG-CPC – Frauenarzt 53 Nr. 12 – 2012 | 29 |
| Tabelle 6 - Probenübersicht nach HPV-Ergebnis und Histologie..... | 45 |
| Tabelle 7 - Messparameter des QG-MPH | 48 |
| Tabelle 8 - Zusammensetzung Working bead mix pro Probe | 50 |
| Tabelle 9 - Zusammensetzung Waschpuffer Tag 2 für eine 96 Well Platte | 50 |
| Tabelle 10 - Auflistung der Reagenzien des QuantiGene 2.0 Plex Assays | 52 |
| Tabelle 11 - Auflistung der Reagenzien für das Luminex Durchflusszytometer | 53 |
| Tabelle 12 - Auflistung der verwendeten Geräte | 53 |
| Tabelle 13 - Aufstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien..... | 54 |
| Tabelle 14 - Verwendete HPV-Tests im Vergleich | 61 |
| Tabelle 15 - HPV-Ergebnisse des QG-MPH Assays | 66 |
| Tabelle 16 - HPV-Ergebnisse QG-MPH für definierte Dysplasiestadien | 67 |
| Tabelle 17 - HPV-Ergebnisse BD Onclarity für CIN2+ | 68 |
| Tabelle 18 - HPV-Ergebnisse BD Onclarity CIN2+ Unterteilung..... | 68 |
| Tabelle 19 - HPV-Ergebnisse Hologic Aptima HPV-Assay für CIN2+ | 69 |
| Tabelle 20 - HPV Ergebnisse Hologic Aptima HPV-Assay für Dysplasiestadien | 69 |
| Tabelle 21 - HPV Ergebnisse Roche Cobas HPV-Assay für CIN2+..... | 70 |
| Tabelle 22 - HPV Ergebnisse Roche Cobas HPV Assay für CIN2+ Unterteilung | 70 |
| Tabelle 23 - HPV Ergebnisse Seegene Anyplex-II HPV-Assay für CIN2+ | 71 |
| Tabelle 24 - HPV Ergebnisse Seegene Anyplex-II HPV-Assay für CIN2+ Aufteilung | 71 |
| Tabelle 25 - HPV Ergebnisse MPG HPV-Assay für CIN2+..... | 72 |
| Tabelle 26 - HPV Ergebnisse MPG HPV-Assay für CIN2+ Unterteilung..... | 72 |
| Tabelle 27 - Gesamtübersicht Ergebnisse HPV-Tests | 73 |
| Tabelle 28 – Übersicht der QG-MPH risk score Ergebnisse der untersuchten Proben für den <CIN2/CIN2+ cut off..... | 75 |
| Tabelle 29 - QG-MPH risc score Auswertung für die verschiedenen histologischen Ergebnisse und HPV Befunde..... | 76 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 30 - QG-MPH risc score Auswertungen nach histologischer Aufteilung – A. Skof modifiziert..... | 77 |
| Tabelle 31 - QG-MPH HPV-Ergebnisse für CIN3 | 79 |
| Tabelle 32 - QG risk score Einteilung Ergebnisse | 80 |
| Tabelle 33 - Relevante Abrechnungsziffern des EBM für das Gebärmutterhalskrebs-screening | 82 |
| Tabelle 34 - Relevante Abrechnungsziffern des EBM für die Abklärungsdiagnostik im Rahmen des Gebärmutterhalskrebscreenings | 83 |
| Tabelle 35 - Aufstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien für den QG-MPH ... | 89 |
| Tabelle 36 - Auflistung der Reagenzien des QG-MPH Assay | 89 |
| Tabelle 37 -Auflistung der Reagenzien für das Luminex Durchflusszytometer | 90 |
| Tabelle 38 - Aufstellung der verwendeten Geräte | 90 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|--|
| CIN | Cervical intraepithelial neoplasia (engl.), Zervikale intraepitheliale Neoplasie |
| CIN1 | Leichtgradige intraepitheliale Neoplasie |
| CIN2 | Mittelgradige intraepitheliale Neoplasie |
| CIN3 | Hochgradige intraepitheliale Neoplasie bzw. Carcinoma in situ |
| CIN2+ | beinhaltet CIN2, CIN3 und invasive Malignome |
| CIN3+ | beinhaltet CIN3 und invasive Malignome |
| HPV | Humanes Papillomavirus |

Zusammenfassung

Hintergrund: für das Zervixkarzinomscreening wird derzeit weltweit die Diagnostik durch HPV-Testung von der WHO empfohlen und ist international etabliert. Aufgrund der verhältnismäßig niedrigen Spezifität für CIN2+ der HPV-Diagnostik im Vergleich zur Zytologie führt ein HPV-basiertes Screening jedoch zu häufiger Überdiagnostik und Übertherapie. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse des neu entwickelten, mRNA-basierten Dysplasietests QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology (QG-MPH) mit den Ergebnissen von fünf Leitlinien-konformen HPV-Screeningtests verglichen. Dieser Test dient der Erkennung von prämaligen Vorstadien und malignen Gewebeveränderungen des Zervixkarzinoms und evaluiert direkt mittels risk-scores, welche Läsionsschweregrade vorliegen bzw. ob und wie diese behandlungsbedürftig sind. Darüber hinaus wird ein mögliches Screeningmodell mithilfe dieses neuen Testverfahrens aufgezeigt.

Methoden: im Rahmen der FACTS-Studie (2019-2022) wurde eine Proben-Subgruppe (n=162) zur HPV-Vergleichstestung im Rahmen dieser experimentellen Arbeit ausgewählt. Eingeschlossen wurden verschiedene Dysplasieschweregrade. Die Proben wurden, neben einer QG-MPH Testung, auch einer Testung mit den fünf ausgewählten HPV-Tests unterzogen. Die Sensitivität der einzelnen HPV-Tests wurde bestimmt. In einem zweiten Schritt wurden diese Ergebnisse mit der Sensitivität und Spezifität des QG-MPG-Assay verglichen.

Für einen Modellvorschlag eines alternativen Screeningalgorithmus wurde eine gesundheitsökonomische Evaluation ausgearbeitet. Diese beinhaltet die Evaluierung der spezifischen Gesamtkosten, die bei der Einführung eines kosteneffizienten Algorithmus eine Rolle spielen sowie weiterer Faktoren.

Ergebnisse: Die vorliegende Arbeit zeigt hohe Sensitivitätsraten aller verwendeten HPV-Tests (88,9 – 93,7 % für CIN2+). Gleichzeitig zeigen sich sehr unterschiedliche Spezifitäten (20,2 – 53,5 % für CIN2+). Der QG-MPH Assay weist im Vergleich eine leicht reduzierte Sensitivität auf (71,4 % für CIN2+) bei höherer Spezifität (58,6 % für CIN2+). Die Modellrechnung für den Kostenvergleich zwischen HPV/Zytologie Co-Testung und einem möglichen QG-MPH Primärscreening zeigt einen wesentlichen Kosten- und Zeitvorteil bei gleichzeitig reduziertem Stress für die einzelne Patientin.

Schlussfolgerung: Der QG-MPH-Assay weist eine höhere Spezifität (58,6 %) auf, als die fünf HPV-Tests. Gleichzeitig liegt eine geringere Sensitivität (71,4 %) vor. Dies könnte durch Verpassen von geringgradigen Dysplasien erklärt werden und würde bei der Detektion von behandlungsbedürftigen Befunden vorteilhaft sein. Eine abschließende Erklärung müssen weitere Untersuchungen zeigen. Der QG-MPH-Assay stellt damit möglicherweise besonders in Ländern mit geringem oder mittlerem Einkommen eine effiziente Screeningalternative zur konventionellen HPV-Testung dar. Gerade dort, wo medizinische Ressourcen limitiert sind, ist der Einsatz des QG-MPH-Assay möglicherweise besonders effektiv.

Abstract - English

Background: For the detection of cervical carcinoma and its premalignant stages, HPV testing has been internationally established as the diagnostic method worldwide. In Germany, HPV diagnostics have been part of the primary screening since 2020, gaining increasing relevance. However, due to its relatively lower specificity for CIN2+ compared to cytology, HPV-based screening leads to frequent overdiagnosis and subsequent overtreatment of patients. In this study, the results of the newly developed mRNA-based dysplasia test called QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology (QG-MPH) are compared with the results of five established and guideline-compliant HPV screening tests. This test aims to identify premalignant stages of cervical carcinoma and directly evaluates the severity of lesions and whether they require immediate treatment. Furthermore, a potential screening model using this new test method is proposed and evaluated based on health economic costs and efficiency.

Methods: Within the FACTS study (2019-2022), a subset of samples (n=162) was selected for HPV comparative testing in the context of this experimental work. The crucial criterion for selection was the presence of a pathological dysplasia result. The included samples encompassed various grades of dysplasia. A range of different histological results was selected, and the samples underwent testing with the five selected HPV tests, in addition to the QG-MPH testing. The sensitivity of each HPV test and its concordance were determined. In a second step, these results were compared with the sensitivity and specificity of the QG-MPG assay. For proposing an alternative screening algorithm model,

a health economic evaluation was conducted. This evaluation included assessing the specific overall costs involved in implementing an efficient algorithm.

Results: The present study demonstrates high sensitivity rates for all utilized HPV tests (88.9 - 93.7% for CIN2+). Simultaneously, there are significant variations in specificity (20.2 - 53.5% for CIN2+). In comparison, the QG-MPH assay shows a slightly reduced sensitivity (71.4% for CIN2+) but higher specificity (58.6% for CIN2+). The cost comparison between HPV/cytology co-testing and a potential QG-MPH primary screening model indicates significant cost and time advantages, while reducing stress for individual patients.

Conclusion: The QG-MPH assay shows higher specificity (58.6%) compared to the five established HPV tests. At the same time, it has a lower sensitivity (71.4%). This might be attributed to potential misses of low-grade dysplasia, but further investigations are required to confirm this. Consequently, the QG-MPH assay could represent an efficient screening alternative to conventional HPV testing, particularly in countries with low or middle incomes. In regions where medical resources are limited, the use of the QG-MPH assay may prove to be particularly effective.

1 Einleitung

1.1 Historischer Hintergrund

Erstmals als eigenständiges Krankheitsbild wurde das Zervixkarzinom bereits im Jahr 1878 von dem Pathologen Carl Ruge und dem Gynäkologen Johann Veit beschrieben. Noch im gleichen Jahr führte Veit bereits die ersten Konisationen durch. (1) (2) Bereits vor diesem Zeitpunkt wurden von zahlreichen Ärztinnen und Ärzten rezidivierende, vaginale Blutungen einhergehend mit starken Schmerzen und vermindertem Allgemeinzustand beschrieben. Aufgrund der mangelnden Kenntnisse zu Ursache und Entstehung dieses Krankheitsbilds waren die diagnostischen Möglichkeiten zu diesem Zeitpunkt sehr beschränkt.

Den Zusammenhang zwischen einer Infektion mit dem sexuell übertragbaren Humanen Papillomavirus (HPV) wurde erst 100 Jahre später wissenschaftlich belegt. Auf dem Weg dorthin beschrieb bereits der italienische Chirurg Demenico Antonio Rigoni-Stern um 1842 eine geringere Prävalenz des Zervixkarzinoms bei Nonnen, die sich in Klöstern dem Zölibat verpflichtet hatten im Vergleich zu verheirateten Frauen. (3)

Es sollte mehrere Jahrzehnte dauern bis im Jahr 1928 der griechische Arzt George Papanicolaou einen entscheidenden Schritt zur Diagnostik und Früherkennung des Zervixkarzinoms veröffentlichte. Seine Forschungsergebnisse zeigten einen Zusammenhang von vaginalen Erkrankungen und einem einhergehend veränderten Zellbild bei Gewebeabstrichen in der Mikroskopie im Vergleich zu Abstrichen von gesunden Frauen. In seinen Ergebnissen beschreibt er ein abnormales Zellwachstum und atypische Kernveränderungen als zentrale Ursache einer malignen Erkrankung der Zervix. (4) (5) (6)

Ein weiterer entscheidender Fortschritt für die Diagnostik des Zervixkarzinoms war die Kolposkopie. Erstmals wurde in der Literatur im Jahr 1933 ein Ansatz zur Etablierung einer kolposkopischen Untersuchung durch H. Hinselmann beschrieben. (7)

Diese Methode ermöglichte eine frühere Erkennung und damit bessere Prognose von Gebärmutterhalskrebs. (8)

Trotz seiner wissenschaftlichen Verdienste wurde ihm später seine Ehrenmitgliedschaft auf Initiative der Arbeitsgemeinschaft für Kolposkopie (AG-CPC) unter Leitung von M. Menton entzogen, nachdem ihm die Teilnahme an Kolposkopie-Versuchen und

Zwangssterilisationen an KZ-Häftlingen in Auschwitz nachgewiesen wurde. Es folgte daraufhin auch der Entzug der Ehrenmitgliedschaft durch die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) im Jahr 2015. (9)

Bei der Kolposkopie wird durch eine Lupenvergrößerung (8-30fach) der Portiooberfläche unter Zuhilfenahme von 3%iger Essigsäureapplikation und nachfolgend Iod-Applikation (Lugolsche Lösung) eine genauere Beurteilung der Veränderungen strukturiert ermittelt anhand von morphologischen Kriterien wie dem ridge sign, inner border oder rag sign. (10) Durch die Entnahme einer Biopsie wird das Ergebnis entsprechend pathologisch gesichert. Die kolposkopische Klassifikation des Dysplasieschweregrades ist heute in der Literatur und medizinischen Versorgung weltweit anerkannt – das Grundprinzip einer Behandlung mit Essig und Iod zur Sichtbarmachung veränderten Gewebes ist weiterhin unverändert. (11)

Den nächsten Meilenstein erbrachte dann 1976 die Forschergruppe von Harald zur Hausen, indem sie das HPV mit der Entwicklung von dysplastischen Veränderungen der Zervix in Verbindung brachten. (12) (13) Dieser Erfolg brachte eine völlig neue Sichtweise in die Ätiologie der Erkrankung, die bis heute Gegenstand aktueller Entwicklungen und Diskussionen zur Prävention, Früherkennung und Therapie ist. In vielen Ländern weltweit hat die Einführung der HPV-Testung erst in der jüngsten Vergangenheit zur Umstellung der Präventionsprogramme geführt. 2008 erhielt zur Hausen für seine Entdeckungen den Nobelpreis im Fach Medizin. Ein Jahr zuvor wurde die HPV-Impfung von der Ständigen Impfkommission (STIKO) des Robert Koch-Instituts als Empfehlung in den Standard-Impfkatalog in Deutschland aufgenommen. (14) (15)

Seit dem Jahr 2020 bilden die drei Methoden bestehend aus Zytologie, HPV-Testung und Kolposkopie die Basis der Zervixkarzinomvorsorge in Deutschland und vielen anderen Ländern weltweit.

1.2 Epidemiologie des Zervixkarzinoms

Mit Einführung von der Gebärmutterhalskrebsvorsorge zur frühen Detektion von Vorstadien des Zervixkarzinoms sind die Inzidenz, Morbidität und Mortalität in den letzten

Jahrzehnten entscheidend verringert worden. Grundlage hierfür war das Zytologie-basierte Screening Programm, welches erstmals im Jahr 1971 in Deutschland gesetzlich eingeführt wurde. So wurde die Inzidenz des Zervixkarzinoms von 36/100.000 (zwischen 1960-66) auf 20,2/100.000 (zwischen 1978-79) gesenkt. (16) Diese Zahlen wurden weiter gesenkt und im Jahr 2012 lag die Inzidenz bei 11/ 100.000 Neuerkrankungen in Deutschland pro Jahr. (17) Insgesamt wurde die Mortalität seit der Einführung des Screenings um über 70% reduziert. (18) (19)

Dennoch ist das Zervixkarzinom weltweit mit über 570.000 registrierten Neuerkrankungen pro Jahr (Stand 2020) weiterhin eines der häufigsten malignen Tumorerkrankungen der Frau. In vielen Ländern (vor allem low- und middle-income countries, LMIC) ist die Inzidenz von Gebärmutterhalskrebs und die einhergehende Mortalitätsrate weiterhin sehr hoch und bleibt beispielsweise auf dem afrikanischen Kontinent die häufigste Krebstodesursache bei Frauen. (20) Neben dem HPV-bedingten Zervixkarzinom gibt es weitere Karzinomentitäten, die im Zusammenhang mit einer HPV-Infektion stehen und in den letzten Jahren an Prävalenz zunehmen (Tab.1). (21)

Tabelle 1 - Weltweit HPV-bedingte Tumorinzidenzen

| | Männer | | Frauen | | Total | |
|-----------------------------|------------|--|------------|--|------------|--|
| | Neue Fälle | Neue Fälle im Zusammenhang mit dem Infektionserreger | Neue Fälle | Neue Fälle im Zusammenhang mit dem Infektionserreger | Neue Fälle | Neue Fälle im Zusammenhang mit dem Infektionserreger |
| <i>Humane Papillomvirus</i> | | | | | | |
| Zervixkarzinom | / | / | 570.000 | 570.000 | 570.000 | 570.000 |
| Oropharynxkarzinom | 110.000 | 34.000 | 26.000 | 8100 | 140.000 | 42.000 |
| Mundhöhlenkrebs | 190.000 | 3900 | 91.000 | 2000 | 280.000 | 5900 |
| Larynxkrebs | 150.000 | 3600 | 22.000 | < 1000 | 180.000 | 4100 |
| Analkarzinom | 9900 | 9900 | 19.000 | 19.000 | 29.000 | 29.000 |
| Peniskarzinom | 34.000 | 18.000 | / | / | 34.000 | 18.000 |
| Vaginalkarzinom | / | / | 18.000 | 14.000 | 18.000 | 14.000 |
| Vulvakarzinom | / | / | 44.000 | 11.000 | 44.000 | 11.000 |

(modifiziert Gynäkologe, 10.2020:1-9, The Lancet, Springer Nature) (22)

Grund für den Rückgang der Inzidenz in Deutschland ist in erster Linie eine Jahrzehntelange gute Vorsorge, mit jährlichen zytologischen Abstrichen. Besonders zeigt sich dies

im Vergleich mit Ländern ohne entsprechendes Früherkennungsprogramm. Dort sind die Inzidenzen für Gebärmutterhalskrebs höher. (23)

Deutschlandweit gibt es 4.320 Zervixkarzinom Neuerkrankungen pro Jahr (2018). Im gleichen Jahr sind deutschlandweit 1.612 Betroffene am Zervixkarzinom verstorben. (24)

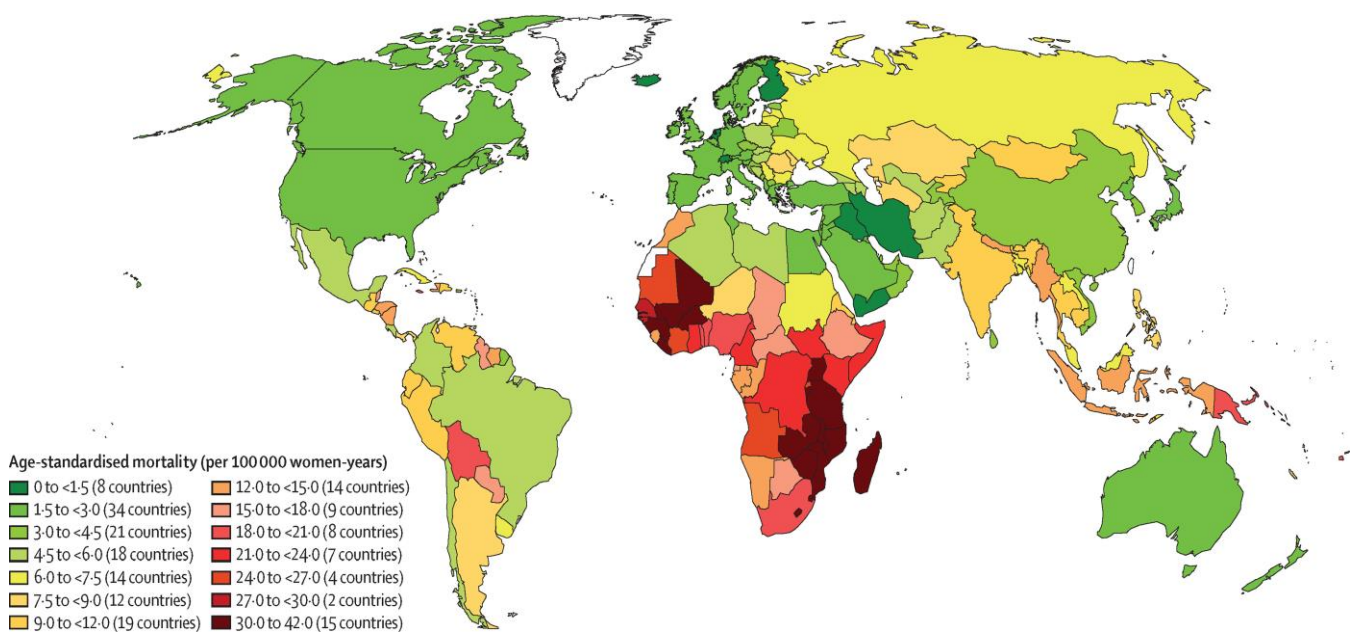


Abbildung 1 – Geschätzte altersstandardisierte Mortalität des Zervixkarzinoms (129)

1.3 Humanes Papillomvirus – HPV

1.3.1 Aufbau und Klassifikation

In Verbindung mit dem Zervixkarzinom ist das unbehüllte HPV erstmals von der Forschungsgruppe unter Harald zur Hausen im Jahr 1976 gebracht worden. Dieser hatte mit seinen Ergebnissen erstmals den Zusammenhang zwischen dem HPV und der Entstehung von einem Zervixkarzinom und dessen Vorstufen aufgezeigt. (25)

Das HPV ist ein doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der Papillomaviridae. Das zirkulär geschlossene Virusgenom umfasst ca. 8000 Basenpaare mit verschiedenen

kodierenden Gensequenzen bei einer Capsidgröße von 55 nm. (26) Durch die beiden Hüllproteine L1 und L2 lassen sich die verschiedenen Virustypen und verschiedene Viruskategorien einteilen. Die häufigsten Kategorien sind dabei die Gruppe der Alpha-, Beta- und Gammapapillomviren. (27) Der codierende Teil des Genoms (sog. open reading frames; ORF) wird in drei funktionelle Regionen unterteilt: Die „early region“ E (early=E) kodiert für die Proteine E1-E7, welche für die Virusreplikation nötig sind. Die „late region“ kodiert für L1-L2, welche das Viruskapsid bilden. Der dritte Teil, die long-control region (LCR), ist größtenteils nicht codierend, steuert aber die Replikation und Transkription viraler DNA. Wie die Bezeichnung bereits erahnen lässt werden „early-Gene“ (E1-E7) zu Beginn des viralen Lebenszyklus exprimiert und ermöglichen die Aufrechterhaltung der Viruspersistenz im infizierten Epithel. (26) Den Genen E6 und E7 kommt dabei besondere Bedeutung in der onkogenen Transformation des Epithels zu (detailliert in Abschnitt 1.3.2). Die beiden „late-Gene“ L1 und L2 bilden die Basis für die Kapsidhülle, die das Virusgenom umgibt. Im Gegensatz zu den „early-Genen“ werden L1 und L2 nur in produktiven Infektionen des Epithels exprimiert. (28)

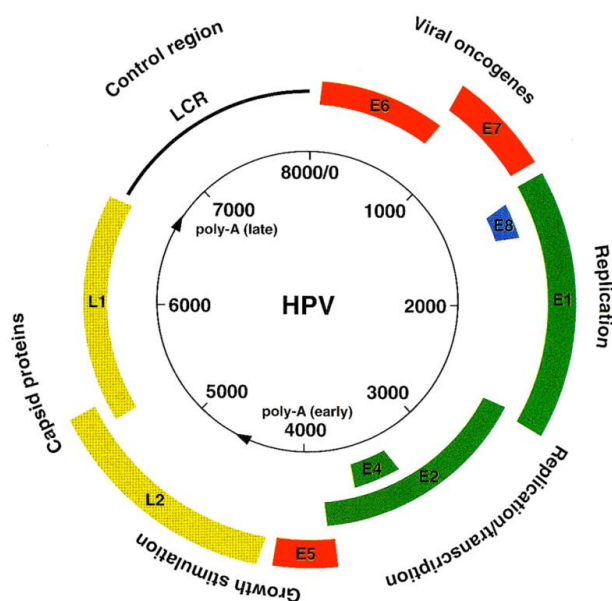


Abbildung 2 - Episom des HPV mit den verschiedenen Codierungsregionen für early (E)- und late (L-) Gensequenzen (30)

Papillomviren infizieren ausschließlich epitheliale Zellen und sind sehr epithelspezifisch. Es werden HPV Typen unterschieden, die die äußeren cornifizierenden Epithelien infizieren von denen die mukosal infizierenden.

Die Prävalenz von mukosal infizierenden HPV in der sexuell aktiven Bevölkerung ist sehr hoch. Diese resultiert aus einer einfachen sexuellen Übertragbarkeit. Unterschiedliche Literatur beschreibt eine Inzidenz von 30% und mehr, jedoch ist die Prävalenz sehr unterschiedlich hoch in verschiedenen Altersgruppen und geografischen Regionen. (29). Die Mehrzahl der verschiedenen Virusgenotypen ist dabei nicht gefährlich für den Menschen. Einige Genotypen können jedoch benigne oder maligne Zell- und Gewebeveränderungen auslösen. (30) Die besonders relevanten Virustypen sind sog. Genus Alpha-Papillomviren, welche hauptsächlich die Schleimhäute infizieren und sich in low-risk (lr) und high-risk (hr) unterteilen lassen. Die Gruppe der hr-HPV-Typen umfasst dabei 13 Virustypen (Typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66), die offiziell durch die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) als karzinogen eingestuft werden. (31) Die lr-HPV-Typen verursachen das Auftreten von genitalen Feigwarzen (*Condylomata acuminata*) z.B. die Typen 6 und 11 (Abbildung 2). Daneben sind noch weitere lr-HPV-Typen bekannt: Typ 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 und 81. (32) Condylome sind meist harmlos, können jedoch unangenehme Symptome wie Juckreiz auslösen. Mittels Laser können diese Hautveränderungen abgetragen werden. (33) (34) In den meisten Fällen heilen die Wunden problemlos ab. In der Altersgruppe von Frauen ab dem 30. Lebensjahr wurde in einer deutschlandweiten Studie eine hr-HPV-Prävalenz von 7,1% in Hannover und 5,9% in Tübingen nachgewiesen. (35) Für Frauen unter 30 Jahren wird in der Literatur eine Prävalenz von 28,3% beschrieben. (36) Eine weitere Studie aus den Jahren 2010-2012 zeigte dabei eine HPV Prävalenz von 38,1% bei ungeimpften Frauen zwischen 20-25 Jahren. (37) Eine HPV-Infektion heilt in den überwiegenden Fällen im Laufe der Zeit spontan aus, durch die Entwicklung einer Immunreaktion gegen Virusantigene.

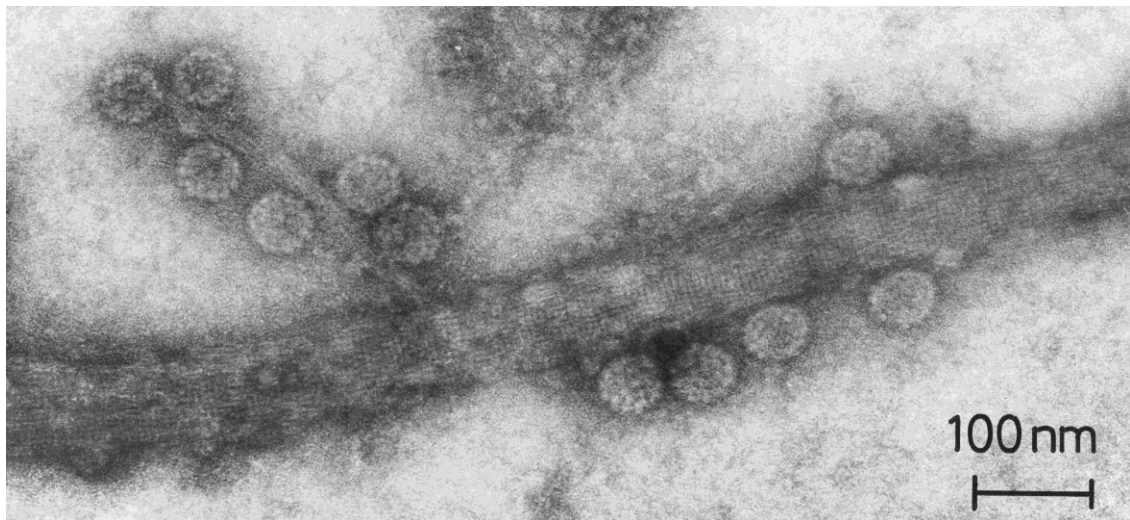


Abbildung 3 - Papillomvirus aus Hautwarze. Transmissions- Elektronenmikroskopie Negativkontrastierung - 2009 RKI (131)

Im Gegensatz hierzu stehen die hr-HPV-Typen im Zusammenhang mit der Entstehung von verschiedenen Karzinomen – unter Anderem Zervixkarzinom, Analkarzinom und Oropharynxkarzinom. Insbesondere für das Zervixkarzinom sind der HPV high-risk Typ 16 und Typ 18 von besonderer Relevanz. In rund 70% der Zervixkarzinome findet sich Typ 16 oder Typ 18. (38) Nimmt man die neun hr-HPV Typen mit der höchsten Korrelation mit dem Vorliegen eines Zervixkarzinoms (Typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58) zusammen, so erreicht man bereits eine Abdeckung von 94%. Die lr-HPV Typen sind dagegen nur in ganz seltenen Fällen mit der Entstehung eines Zervixkarzinoms assoziiert. (39)

1.3.2 Onkogene Transformation der Zervikalzellen durch HPV

Um den Transformationsprozess eines physiologischen Zervixepithels hin zu einem Dysplasiebefund bzw. Zervixkarzinoms zu verstehen ist zunächst ein Verständnis über den physiologischen Aufbau der Zervix nötig. Entscheidend für den späteren dysplastischen Prozess ist die Grenze von Plattenepithel und Zylinderepithel der Zervix. (40) Beginn einer onkogenen Transformation ist die Infektion der Basalzellen der zervikalen Transformationszone über eine Bindung des Capsids über L1 an das Heparansulfat-Proteoglykan der Extrazellulären Matrix -

in aller Regel nach sexueller Übertragung. (41) Nach erfolgter Infektion des HPV startet die Latenzphase mit geringer Virusaktivität. Die meisten Infektionen heilen in dieser Phase durch die körpereigene Immunaktivität aus. Ein Teil der Infektionen progrediert hingegen zur permissiven Infektionsphase. (42) In dieser Phase werden die Gene E6 und E7 exprimiert, die eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des Virus initiieren. Dabei ist die virale Vermehrung von HPV abhängig von der Zellteilung der Basalzellen. Ausgehend von dieser zweiten Phase kann eine Transformationsphase eingeleitet werden. Diese wird eingeleitet, sofern die repressive Kontrolle der Expression von E6 und E7 durch E2 durchbrochen wird. Es kommt somit zu einer unkontrollierten Überexpression von E6 und E7, welche die pathogene Transformation einleitet. (30) Abbildung 4 zeigt den onkogenen Transformationsprozess nach erfolgter HPV-Infektion bis zu einem invasiven Zervixkarzinom.

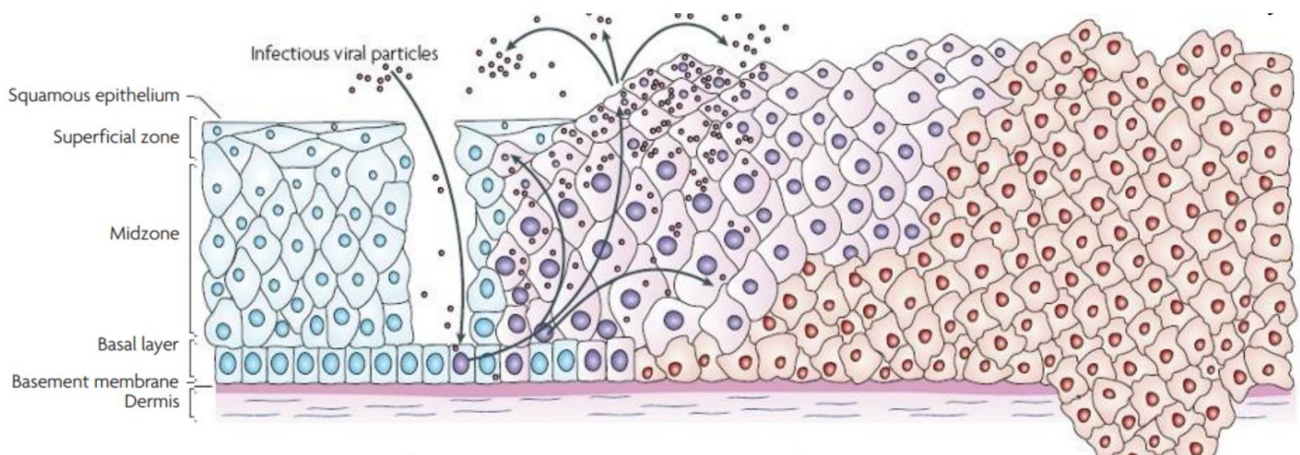


Abbildung 4 - Stadien der HPV-Infektion. Physiologisches Epithel (blau), infizierte Zellen in der permissiven Phase (violett), Transformationsphase bei aufgehobener Onkogenkontrolle durch E2 und Überexpression von E6/7 (rot) –Nature Reviews Cancer – 2007 (132)

1.4 Prävention des Zervixkarzinoms

1.4.1 Primärprävention Impfung

Bereits im Jahr 2006 wurde der erste Impfstoff gegen HPV in den USA durch die FDA zugelassen – rund 30 Jahre nach den ersten Erkenntnissen eines Zusammenhangs

zwischen HPV-Infektion und Zervixkarzinom. (43) Aktuell sind die Impfstoffe Cervarix®, Gardasil®4 und Gardasil®9 zugelassen. Sie decken folgende HPV-Genotypen ab:

Tabelle 2 - Übersicht HPV-Impfstoffe

| | |
|------------|---|
| Cervarix® | HPV Typ 16, 18 |
| Gardasil®4 | HPV Typ 16, 18, 6, 11 |
| Gardasil®9 | HPV Typ 16, 18, 6, 11, 31, 33, 45, 52, 58 |

Bekanntlich sind die beiden hr-HPV-Genotypen 16 und 18 für rund 70% der Zervixkarzinome verantwortlich und daher in allen drei Impfstoffen enthalten. Kondylome werden hingegen in aller Regel von niedrig Risiko (r. engl. *low-risk*) HPV-Genotypen ausgelöst, weshalb beide Gardasil® Impfstoffe die Typen 6 und 11 abdecken. (44) Für eine bestmögliche Wirkung der Impfung wird sie für alle Mädchen und Jungen vor dem ersten Sexualkontakt empfohlen. (45) (46) Die Wirkung der Impfung ist dabei unumstritten. Eine in Schweden durchgeführte Registerstudie bei Frauen zwischen dem 10.-30. Lebensjahr (durchgeführt zwischen 2006-2017) zeigte eine reduzierte Inzidenz für das Zervixkarzinom der geimpften Kohorte um 63%. Für die Teilnehmerinnen, die bereits vor dem 17. Lebensjahr vollständig geimpft waren, ergab sich sogar eine Reduktion um 88%.

In Deutschland gibt es eine Empfehlung zur HPV-Impfung für Mädchen seit dem Jahr 2007 durch die Ständige Impfkommission (STIKO). Ursprünglich galt die Empfehlung nur für Mädchen zwischen dem 12-17 Lebensjahr. Seit dem Januar 2020 wird die Impfung für Mädchen und auch für Jungen zwischen dem 9.-14. Lebensjahr empfohlen. Für diese Altersgruppen werden zwei Impfstoffdosen empfohlen. (46) (47) Im Jahr 2018 lag die Rate der 18-jährigen Frauen mit vollständiger Impfung bundesweit bei 51,1%. Im gleichen Jahr lag die Impfquote der 18-jährigen Männern bei 1,3%. (48) Im Jahr 2020 konnte die Impfquote auf 7,6% gesteigert werden. (49) Für eine noch effektivere Prävention und weiteren Reduktion der Inzidenz für das Zervixkarzinom ist in den kommenden Jahren eine Erhöhung der Impfraten in Deutschland von entscheidender Bedeutung.

1.4.2 Sekundärprävention Deutschland – neuer Co-Test Algorithmus 2020

Nach fast fünf Jahrzehnten Zytologie-basiertem Screening wurde am 1.1.2020 das Co-Testing in Deutschland eingeführt. (50) Zum ersten Mal wird hiermit der HPV-Test in Deutschland in Form einer Screeningleistung eingesetzt. Vor allem behandlungsbedürftige Vorstufen (ab CIN2+) des Zervix-Karzinoms sollen hiermit besser detektiert werden und die Sensitivität mit der Kombination von Zytologie und HPV-Testung erhöht werden. (51)

Mit der Einführung des Zytologie-basierten Gebärmutterhalskrebscreening in Deutschland im Jahr 1971 wurde die Inzidenz bereits entscheidend verringert. Dennoch wurde in den letzten Jahren eine große Diskussion zum Erhalt und Veränderung des Cervix-Ca Screenings geführt, welche letztlich mit dem G-BA Beschluss vom 22. November 2018 eine erste Zwischenetappe erreicht hat. (52) Erstmals wird demnach der HPV-Test in Kombination mit einem zytologischen Abstrich beurteilt – im Intervall alle drei Jahre für alle Frauen ab dem 35. Lebensjahr. Frauen zwischen 20-34 Jahren bekommen weiterhin eine jährliche zytologische Kontrolle vergütet, da die HPV-Prävalenz in dieser Altersgruppe sehr hoch ist und somit eine generelle HPV-Testung nicht sinnvoll. Man erhofft sich hierbei eine weitere Reduktion der Inzidenz des Cervix-Ca und eine deutliche Verbesserung der Sensitivität in der Detektion von behandlungsbedürftigen Dysplasievorstufen des Cervix-Ca.

Auch international ist das Thema Früherkennung von Gebärmutterhalskrebs und seiner Vorstufen weiterhin umfangreich in der Diskussion. Im Mai 2018 veröffentlichte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine Strategie zur weltweiten Eliminierung von Gebärmutterhalskrebs mit der Zielsetzung bis 2100 die Inzidenz auf unter 4/100.000/Jahr zu reduzieren. Die Eckpunkte dieser Strategie beinhaltet dabei eine 90% Impfquote aller Mädchen bis zum 15. Lebensjahr. Darüber hinaus sollte eine Screeningteilnahme von 70% aller Frauen bis zum 35. Lebensjahr mittels eines „high performance test“ erreicht werden und eine erneute Testung zum 45. Lebensjahr. Dritter Eckpfeiler ist die Behandlung von 90% aller Frauen mit Zervixkarzinomvorstufen bzw. Cervix-Ca („90-70-90 target“ – zu erreichen bis 2030). (53)

1.5 Zytologie nach Papanicolaou

In Deutschland wurde die jährliche Zytologie bei Frauen ab dem 20. Lebensjahr bereits im Jahr 1971 in das gesetzliche Vorsorgeprogramm zur frühen Detektion von Dysplasievorstufen an der Zervix aufgenommen und ist noch heute ein Bestandteil des aktuellen Co-testings.

Der Ablauf zur Gewinnung eines Pap-Abstrichs umfasst zunächst eine Zellaufnahme mittels Bürste bzw. Szalay-Spatel. Dabei ist es wichtig, dass sowohl Zellen von der Portiooberfläche als auch aus dem Zervikalkanal entnommen werden. (54) Direkt im Anschluss werden die Zellen von dem Abnahmebesteck auf einen Objektträger übertragen und mittels Fixierspray bzw. Alkohol (wahlweise 96% Isopropylalkohol oder 96% vergällter Äthylalkohol) fixiert. Bevor eine Diagnose gestellt werden kann, erfolgt eine Spezialfärbung nach Papanicolaou. Diese umfasst verschiedene Stufen mit Hämatoxylin, OrangeG und einer aufsteigenden Alkoholreihe. Nach erfolgreicher Färbung des Objektträgers werden die Zellen unter einem Mikroskop beurteilt und nach der Münchner Nomenklatur (Tabelle 3) eingeordnet. Diese umfasst eine Stufeneinteilung von Pap I-V. Das entsprechende Korrelat zur Münchner Nomenklatur ist die Einteilung nach Bethesda, welche unter anderem in den USA verwendet wird. (55)

Tabelle 3 - Zytologische Nomenklatur München III – gültig ab 01.2015 in Deutschland – AG-CPC (130)

| | | |
|--------------|--|--|
| 0 | Unzureichendes Material → <i>Abstrichwiederholung</i> | Unsatisfactory for evaluation |
| I | Unauffällige und unverdächtige Befunde → <i>Abstrich im Vorsorgeintervall</i> | NILM |
| II-a | Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese → <i>ggf. zytologische Kontrolle wegen auffälliger Anamnese (zytologischer/histologischer/kolposkopischer/klinischer Befund)</i> | NILM |
| II | Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert | |
| II-p | Plattenepithelzellen mit geringergradigen Kernveränderungen als bei CIN 1, auch mit koilozytärem Zytoplasma/Parakeratose → <i>ggf. zytologische Kontrolle unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischem Befund (evtl. nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung; in besonderen Fällen additive Methoden und/oder Kolposkopie)</i> | ASC-US |
| II-g | Zervikale Drüsenzellen mit Anomalien, die über das Spektrum reaktiver Veränderungen hinausreichen → <i>ggf. zytologische Kontrolle in Abhängigkeit von Anamnese und klinischem Befund (evtl. nach Entzündungsbehandlung; in besonderen Fällen additive Methoden und/oder Kolposkopie)</i> | AGC endocervical NOS |
| II-e | Endometriumzellen bei Frauen > 40. Lebensjahr in der zweiten Zyklushälfte → <i>Klinische Kontrolle unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischem Befund</i> | Endometrial cells |
| III | Unklare bzw. zweifelhafte Befunde | |
| III-p | CIN 2/CIN 3/Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen → <i>Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden, evtl. kurzfristige zytologische Kontrolle nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung</i> | ASC-H |
| III-g | Ausgeprägte Atypien des Drüsenepithels, Adenocarcinoma in situ/invasives Adenokarzinom nicht auszuschließen → <i>Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden</i> | AGC endocervical favor neoplastic |
| III-e | Abnorme endometriale Zellen (insbesondere postmenopausal) → <i>Weiterführende klinische Diagnostik, ggf. mit histologischer Klärung</i> | AGC endometrial |
| III-x | Zweifelhafte Drüsenzellen ungewissen Ursprungs → <i>Weiterführende Diagnostik (zum Beispiel fraktionierte Abrasio; ggf. additive Methoden/Differentialkolposkopie)</i> | AGC favor neoplastic |
| IIID | Dysplasiebefunde mit größerer Regressionsneigung | |
| IIID1 | Zellbild einer leichten Dysplasie analog CIN 1 → <i>Zytologische Kontrolle in sechs Monaten, bei Persistenz > ein Jahr; ggf. additive Methoden/Differentialkolposkopie</i> | LSIL |
| IIID2 | Zellbild einer mäßigen Dysplasie analog CIN 2 → <i>Zytologische Kontrolle in drei Monaten, bei Persistenz > sechs Monate; Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden</i> | HSIL |
| IV | Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms → <i>Differentialkolposkopie und Therapie</i> | |
| IVa-p | Zellbild einer schweren Dysplasie/eines Carcinoma in situ analog CIN 3 | HSIL |
| IVa-g | Zellbild eines Adenocarcinoma in situ | AIS |
| IVb-p | Zellbild einer CIN 3, Invasion nicht auszuschließen | HSIL with features suspicious for invasion |
| IVb-g | Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen | AIS with features suspicious for invasion |
| V | Malignome → <i>Weiterführende Diagnostik mit Histologie und Therapie</i> | |
| V-p | Plattenepithelkarzinom | Squamous cell carcinoma |
| V-g | Endozervikales Adenokarzinom | Endocervical adenocarcinoma |
| V-e | Endometriales Adenokarzinom | Endometrial adenocarcinoma |
| V-x | Andere Malignome, auch unklaren Ursprungs | Other malignant neoplasms |

In den letzten Jahren wurde die Effizienz der Zytologie vielfach diskutiert. In erster Linie steht die geringe Sensitivität der Zytologie in der Kritik. Diese variiert je nach Literatur teilweise sehr stark. Eine Studie in Deutschland mit einem Patientinnenkollektiv einer

gynäkologischen Sprechstunde konnte eine Sensitivität von 84,9% für CIN2+ und 93,9% für CIN3+ zeigen. (56) Eine weitere deutsche Studie hingegen kam auf eine Sensitivität von nur 43,5% für CIN2+. (57) Allerdings ist die Zytologie durch ihre hohe Spezifität für höhergradige Läsionen CIN2/CIN3 (95%-97%), nach wie vor ein wichtiger Teil der Früherkennung. (58) (59) (60) (61) Die Qualität und Diagnostik in der Zytologie ist dabei stark von der durchführenden Person und dem jeweiligen Ausbildungsstand abhängig.

International wie auch in Deutschland hat sich in den vergangenen Jahren die Dünnschichtzytologie etabliert. Im Unterschied zur konventionellen Zytologie werden hier die Zellen in einem Plastikgefäß mit einer Fixierlösung gewonnen und anschließend im Labor speziell aufgearbeitet. Hierzu wird das Zellmaterial als Monolayer ohne Schleim und Debris auf einen speziell beschichteten Objektträger transferiert. Als letzter Schritt werden die aufgearbeiteten Zellen wieder nach Papanicolaou angefärbt und mikroskopisch beurteilt. Entgegen der vielfach beworbenen Vorteile diese Methode konnte keine höhere Sensitivität oder Spezifität nachgewiesen werden. (62) (63) (64)

1.6 Leitlinienkonforme HPV-Tests

Nach der Einführung der HPV-Testung in vielen Zervixkarzinom Screeningprogrammen weltweit, ist der Markt in den letzten Jahren enorm gewachsen. Aktuell gibt es mehr als 200 verschiedene HPV-Tests auf dem Markt. (65) (66)

Die jeweiligen Methoden zum Nachweis von HPV variieren abhängig von den unterschiedlichen Testsystemen. Bei den Nachweismethoden handelt es sich um eine Detektion von HPV-DNA oder HPV-mRNA. HPV-DNA ist in allen Phasen einer Dysplasie detektierbar und kann keine Aussage darüber machen, ob eine aktive Infektion mit möglicher onkogener Transformation vorhanden ist. Die HPV-mRNA ist als Replikationsprodukt nur bei aktiver Infektion nachweisbar. (67) Die Zielregion für den HPV-Nachweis ist dabei typischerweise E6/E7 oder die L1-Region des Virus. Die in Deutschland verwendeten Tests umfassen die hr-HPV Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68. Die lr-HPV Typen sind nicht in den Screeningtests inkludiert. Diese werden nur bei konkretem Verdacht zusätzlich getestet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten

HPV-Tests werden in ihrer Funktionsweise und Testprinzip ausführlich in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Weiteres grundlegendes Unterscheidungsmerkmal ist die Möglichkeit für eine Genotypisierung der einzelnen HPV-Typen. Diese Möglichkeit ist bei verschiedenen HPV-Tests unterschiedlich weit ausgeprägt. Bei den in Deutschland am häufigsten verwendeten HPV-Tests ist mindestens eine Genotypisierung der Typen HPV-16 und HPV-18 möglich. Wissenschaftlich wird die Notwendigkeit zu einer weiter ausgeprägten Genotypisierung diskutiert.

Für die HPV-Testung wurden international verschiedene Gütekriterien entwickelt, damit die Testsysteme auch zuverlässige Screeningergebnisse liefern. Ein Qualitätskriterium für die Validierung von HPV-Tests sind die sog. Meijer Kriterien. (68) Diese wurden ursprünglich für ein Szenario mit primärem HPV-Screening für Frauen ab dem 30. Lebensjahr entwickelt und umfassen folgende Punkte:

1. Detektion der hr-HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
2. Der HPV-Test muss mindestens 90% der Sensitivität erbringen, die ein etablierter und validierter HPV-Test für eine schwergradige zervikale Dysplasie (CIN2+) vorweist. (Goldstandard-Vergleichstests sind der GP5+/6+-Assay und der Qiagen Hybrid Capture II)
3. Der HPV-Test darf nicht weniger als 98% der Spezifität eines etablierten und validierten HPV-Tests für CIN2+ vorweisen.
4. Die interne und externe Reproduzierbarkeit soll ein übereinstimmendes Messergebnis in nicht weniger als 87% der Fälle zeigen.

Diese Kriterien bilden die Grundlage für die in der Leitlinie vorgegebenen Eigenschaften für ein HPV-Testsystem. Im Folgenden der Ausschnitt aus der Leitlinie zu den Kriterien der HPV-Testung in Deutschland und der daraus abgeleiteten Konsensbasierten Empfehlung. (69)

Konsensbasierte Empfehlung

Es sollen nur HPV Testverfahren angewendet werden, die alle folgenden Kriterien erfüllen (nach Meijer et al. und Stoler et al.):

1. Detektion der Hochrisiko-HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68
2. Mindestens 90% der Sensitivität eines etablierten und validierten HPV-Tests* für CIN2+
3. Mindestens 98% Spezifität eines etablierten und validierten HPV-Tests* für CIN2+. Der Anteil positiver Testergebnisse in zytologisch negativen Frauen einer Screeningpopulation soll nicht größer sein als der von validierten und etablierten HPV-Tests*.

Die Inter und Intra-Labor Reproduzierbarkeit (durchgeführt von verschiedenen Personen und auf unterschiedlichen Geräten) sollte mindestens 90% betragen.

* s. [Tabelle 7.1](#)

Konsensusstärke: 87,5% (DKFZ und Gesellschaft für Virologie e.V. enthielten sich wegen Interessenkonflikten von der Abstimmung)

Abbildung 5 - Empfehlung zur Verwendung von HPV-Testsystemen im Rahmen des Gebärmutterhalskrebscreenings in Deutschland – AWMF S3-Leitlinie – 2017 (69)

Die meisten HPV-Testsysteme auf dem Markt erfüllen diese vorgegebenen Kriterien nicht oder nur teilweise. Die folgende Aufstellung aus der S3-Leitlinie (Tabelle 4) gibt eine Übersicht zu den leitlinienkonformen HPV-Tests in Deutschland.

Entscheidend für die tatsächliche Verwendung eines HPV-Tests ist die Richtlinie durch den Gemeinsamen Bundesausschuss (G-Ba) aus dem Jahr 2019. Für die Zusammenstellung der verbindlichen Kriterien im Zusammenhang mit der Durchführung von HPV-Testung orientiert sich die Richtlinie an den Empfehlungen der S3-Leitlinie Zervixkarzinom (2017) und der EU-Leitlinie 2nd Edition Supplements (2015). (70)

Tabelle 4 - Leitlinienkonforme HPV-Testsysteme – AWMF S3-Leitlinie – 2017 (69)

| Test | HPV Typen | Test-system | Kompatible Proben-transportmedien | Zulassungen bzw. Zertifikate/ Bemerkungen |
|--|---|-------------------|---|---|
| Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test (QIAGEN Gaithersburg, Inc.) | 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 | DNA: whole genome | <ul style="list-style-type: none"> • digene Specimen Transport Medium™ • Cytoc ThinPrep® Pap test PreservCyt® Solution • TriPath Imaging® SurePath® Preservative Fluid | FDA, CE Longitudinale Daten für bis zu 5-jährige Intervalle vorhanden [197] |
| cobas HPV Test (Roche Diagnostics) | HPV16/18 Genotypisierung und 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 Detektion | DNA: L1 | <ul style="list-style-type: none"> • Roche cobas® PCR Cell Collection-Medium • Cytoc ThinPrep® Pap test PreservCyt® Solution • TriPath Imaging® SurePath® Preservative Fluid | FDA, CE Longitudinale Daten für bis zu 3-jährige Intervalle vorhanden [198] |
| Cervista™ HPV HR and Genfind™ DNA Extraction Kit (Hologic) | 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 | DNA: E6/E7/L1 | <ul style="list-style-type: none"> • Cytoc ThinPrep® Pap test PreservCyt® Solution • TriPath Imaging® SurePath® Preservative Fluid | FDA, CE / Studien [199, 200] haben gezeigt, dass für die zuverlässige Anwendung im Primärscreening eine Anpassung des FOZ Wertes von derzeit 1,93 auf 4,0-5,0 notwendig ist. |
| APTIMA HPV Assay (Hologic) | 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 | RNA: E6/E7 | <ul style="list-style-type: none"> • Aptima Cervical Specimen Collection and Transport Kit • Cytoc ThinPrep® Pap test PreservCyt® Solution (• TriPath Imaging® SurePath® Preservative Fluid: nur bei Anwendung mit Tigris DTS oder Panther System) | FDA, CE Longitudinale Daten für bis zu 3-jährige Intervalle vorhanden [201] |
| Abbott RT High-risk HPV Test | HPV16/18 Genotypisierung und 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 Detektion | DNA: L1 | <ul style="list-style-type: none"> • Cytoc ThinPrep® Pap test PreservCyt® Solution • TriPath Imaging® SurePath® Preservative Fluid • Abbott Cerci-Collect Specimen Collection Kit | Longitudinale Daten für bis zu 3-jährigen Intervallen vorhanden [202] |
| BD Onclarity HPV Test | 16,18,31,45,51,52; 33-58; 56-59-66; 35-39-68 | DNA: E6/E7 | <ul style="list-style-type: none"> • Cytoc ThinPrep® Pap test PreservCyt® Solution • BD SurePath® Preservative Fluid • BD Onclarity HPV Cervical Brush Collection Kit, | Eine in 2015 erschienene Neuauflage der Meijer Konsortialkriterien [203] hat mittels einer Meta-Analyse die Erfüllung der Kriterien bestätigt. |
| Papillocheck HPV Test | 16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,70,73,82,6,11,40,42,43,44. | DNA: E1 | <ul style="list-style-type: none"> • Cytoc ThinPrep® Pap test PreservCyt® Solution • TriPath Imaging® SurePath® Preservative Fluid • PapilloCheck® Collection Kit • digene Specimen Transport Medium™ | |

1.7 Kolposkopische Abklärung & operative Intervention

1.7.1 Kolposkopie

Die kolposkopische Untersuchung ist ein zentraler Baustein für die weitere Abklärung von auffälligen Screeningbefunden im Rahmen von HPV- und/oder Zytologie-basierter Screeningalgorithmen. Es handelt sich bei der Kolposkopie um eine Lupenvergrößerung der Portiooberfläche zur genauen Betrachtung von Lokalisation und Ausdehnung der dysplastischen Gewebeveränderungen. (11) Bei dem Kolposkop handelt es sich um einen binokularen optischen Tubus oder auch um eine digitale optische Einheit, die über eine Brennweite von 20-50cm verfügt. Somit ist eine Betrachtung der Portiooberfläche möglich, ohne das Kolposkop in die Vulva einzuführen.

Der erste Schritt einer Kolposkopie ist die korrekte Einstellung der Portio und die Beurteilung in Nativoptik. Hierzu ist zunächst ein Säubern der Portio und Entfernung von Schleimauflagerungen notwendig. Durch die Vergrößerung mittels Kolposkop ist eine genauere Betrachtung der Vaskularisierung, Niveauverhältnisse und Epithelfarbgebung möglich. Diese lassen Rückschlüsse auf eine mögliche dysplastische Veränderung zu. Im Anschluss an die Nativbetrachtung folgen die Essigsäureprobe und Jodprobe als weitere Schritte. (71)

Bei der Essigsäureapplikation wird 2-5% Essigsäure mittels Wattetupfer direkt auf die Portiooberfläche aufgetragen. Bei der Essigsäureprobe macht man sich das Prinzip einer reversiblen Transparenzreduzierung und Weißfärbung von proteinhaltigen Plattenepithelzellen zu nutze. Normales Epithel färbt sich nur schwach weißlich an, wohingegen dysplastisch verändertes Gewebe eine starke Essigsäurereaktion mit kräftiger Weißfärbung zeigt. (72) Danach erfolgt die Jodprobe. Hierfür wird mittels Wattetupfer eine Jod-Lösung direkt auf die Portio aufgetragen. Das in den Zellen gespeicherte Glykogen verursacht bei dieser Applikation eine gleichmäßig braune Verfärbung der Portio. (73) Dysplastisch verändertes Gewebe enthält weniger Glykogen und färbt sich daher nicht mit Jod an. Insbesondere die Grenzzone zwischen physiologischem und pathologischem Gewebeübergang kann mithilfe dieser Probe gut dargestellt werden. Wenn bei der kolposkopischen Untersuchung eine dysplastische Veränderung vermutet wird, folgt eine Stanzbiopsie mithilfe einer Biopsiezange an einer oder mehreren Stellen. Das

Ergebnis wird somit histologisch gesichert und es kann eine Therapieempfehlung in Abhängigkeit vom pathologischen Ergebnis erfolgen.

Die diagnostische Beurteilung der kolposkopischen Untersuchung erfolgt anhand der folgenden Kriterien und wird anhand der Rio-Klassifikation (Tabelle 5) eingeteilt. Abnorme Befunde werden kolposkopisch in die Kategorien „minor changes“ (entspricht geringgradiger Dysplasie) und „major changes“ (hochgradige Dysplasie) eingeteilt. Für die histologische Beurteilung erfolgt die Einteilung anhand des Dysplasiegrad in CINI-CINIII (zervikale intraepitheliale Neoplasie). Histologisches Korrelat zu einer geringgradigen Dysplasie ist eine CINI/CINII. Entsprechend geht eine schwergradige Dysplasie (major lesion) mit einer CINIII einher.

Tabelle 5 - Kolposkopische Nomenklatur AG-CPC – Frauenarzt 53 Nr. 12 – 2012 (133)

| Kolposkopische Nomenklatur der Cervix uteri (IFCPC 2011) | | |
|---|-----------------------------------|--|
| Grundsätzliches | | <ul style="list-style-type: none"> - adäquat/inadäquat: Begründung: z. B.: Entzündung, Blutung, Narben - Zylinder-Plattenepithel-Grenze (ZPG): vollständig/teilweise/nicht einsehbar - Transformationszone (Typ 1, 2, 3) |
| Normale Befunde | | <ul style="list-style-type: none"> Originäres Plattenepithel - reif - atroph Zylinderepithel - Ektopie Metaplastisches Plattenepithel - Ovula Nabothii - Drüsenausführungsgänge Deziduose in der Schwangerschaft |
| Abnorme Befunde | Grundsätzliches | <ul style="list-style-type: none"> Lokalisation der Läsion: - innerhalb oder außerhalb der TZ Größe der Läsion: - Anzahl der betroffenen Quadranten - Prozent der Zervix |
| | Grad 1 „minor changes“ | <ul style="list-style-type: none"> - zartes essigweißes Epithel - zartes Mosaik, zarte Punktierung |
| | Grad 2 „major changes“ | <ul style="list-style-type: none"> - intensiv essigweißes Epithel - grobes Mosaik, grobe Punktierung - prominente Drüsenausführungsgänge - scharfe Grenzen - „inner border sign“, „ridge sign“ - rasche Essigsäurewirkung |
| | nicht spezifisch | <ul style="list-style-type: none"> - Leukoplakie (Keratose, Hyperkeratose) - Erosion - Lugol'sche Probe (Schiller-Test) |
| Verdacht auf Invasion | | <ul style="list-style-type: none"> - Atypische Gefäße - Zusätzliche Befunde: auf Berührung blutende Gefäße, unregelmäßige Oberfläche, exophytische Läsion, Nekrose, Ulkus, Tumor |
| Verschiedene Befunde | | <ul style="list-style-type: none"> - kongenitale Transformationszone (KTZ), kongenitale Anomalie - Kondylome (Papillome) - Endometriose - Polypen (ektozervikal, endozervikal) - Entzündung - Stenose - postoperative Veränderung (vernarbte Portio, Scheidenblindsack) |

1.7.2 Konisation und Lasertherapie

Nachdem im Rahmen der kolposkopischen Untersuchung eine höhergradige Dysplasie (CIN2+) festgestellt wurde, ist prinzipiell eine weitere Behandlung indiziert. Die Behandlung von höhergradigen zervikalen Dysplasien erfolgt in der Regel durch eine Konisation oder Lasertherapie. Darüber hinaus gehende Läsionen im Rahmen einer invasiven Zellveränderung (Karzinom) bedürfen einer ausgedehnteren chirurgischen Therapie im Rahmen einer stationären Versorgung.

Die Konisation kann in aller Regel als ambulanter Eingriff durchgeführt werden, wodurch die Patientin noch am gleichen Tag wieder nach Hause gehen kann. Für eine histologische Diagnose wird anschließend das Resektat pathologisch begutachtet und die Schnittländer nach dysplasiefreiem Gewebe untersucht. (11) (71)

Bei einer Konisation wird ein Kegel mittels Messer, Laser oder elektrischer Schlinge aus dem Zentrum der Portio entfernt. Die Kegelgröße und Lokalisation richtet sich dabei nach dem Dysplasiegrad und der Ausdehnung der Läsion. Je nach Tiefe des Kegels kann sich dies negativ auf einen späteren Kinderwunsch auswirken. Nach Ausschnitt des betroffenen Gewebes folgt eine Abrasio des Zervikalkanals. Diese Ausschabung erweitert die histologische Diagnostik und liefert Informationen über eine mögliche tiefergehende Läsion in den Zervikalkanal. (11)

1.8 Biomarker für das Zervixkarzinom und zervikaler Dysplasien im QG-MPH Assay

Biomarker haben in den letzten Jahren bei der Diagnostik von verschiedenen Karzinomen und deren Vorstufen erheblich an Bedeutung gewonnen. Sie helfen die Diagnostik verlässlicher und besser reproduzierbar zu machen. Bei Diagnostik von einem Zervixkarzinom und den dysplastischen Vorstufen haben sich vor allem bei der pathologischen Beurteilung von Biopsien und Resektaten (nach erfolgter Konisation) verschiedene Biomarker etabliert. Die am häufigsten verwendeten Marker im Rahmen des Gebärmutterhalskrebsscreenings sind hierbei der Proliferationsmarker Ki-67 und der Tumorsuppressor p16^{ink4a}. Auch in der Zytologie ist mit dem CINTtec Plus (Roche Diagnostics, Basel) ein

immunhistologisches Verfahren im Einsatz, das vor allem von zytologisch tätigen Pathologen eingesetzt wird. (74) Im Nachfolgenden wird eine Übersicht sämtlicher Biomarker aufgezeigt, die im QG-MPH Assay verwendet werden.

1.8.1 Onkoproteine und Splicemarker

Onkoproteine beeinflussen die dysplastische Veränderung von Zellen und haben somit einen zentralen Anteil bei der Entstehung von Karzinomen. Eine hohe Expression dieser Onkoproteine weist auf eine stark entartete Zelle hin.

E6/E7

Für eine onkogene Transformation des Zervixepithels sind die viralen Proteine E6 und E7 des HPV von zentraler Bedeutung. Es konnte dabei gezeigt werden, dass das Vorhandensein von E6 und E7 Aktivität obligat für ein HPV-induziertes Zervixkarzinom ist. (75)

Auf dem Weg zur malignen onkogenen Transformation durchläuft das Zervixepithel verschiedene Stadien, auf welche die Onkoproteine E6 und E7 einen entscheidenden Einfluss haben. Pal und Kundu (2019) listen hierzu sechs unterschiedliche Teilschritte auf, die für E6 und E7 bedingte Zelltransformation wichtig sind. (76)

1. Ausweichen der Wachstumssuppressoren („Evasion of Growth Suppressors“) für eine unkontrollierte Proliferation ist eine Deregulierung der Wachstumssuppressoren notwendig. E6 ubiquitiniert p53 mittels E6AP (auch als UBE3A bekannt) und sorgt damit für eine Degradierung. (77) Dadurch wird ein Zellteilungsstopp und die Apoptose, die durch genetische Schäden ausgelöst würde, unterbunden.
2. Zelltodresistenz („Resisting Cell Death“) Der Zelltod einer Zelle tritt nach einem Ungleichgewicht zwischen proapoptischen Faktoren und antiapoptischen Faktoren ein. E6 blockiert die Apoptose dabei sowohl über p53-abhängige Wege, als auch p53-unabhängige Apoptosewege.

3. Nachhaltige Proliferationssignale („Sustained Proliferative Signaling“) werden durch E7 induziert, indem es mit pRB interagiert und damit der Proliferationsfaktor E2F freigesetzt wird, der proliferationsfördernde Genexpression reguliert.
4. Ermöglichung replikativer Unsterblichkeit („Enabling Replicative Immortality“) Während der Replikation verkürzen sich die Telomerenden aufgrund des Zellalterungsprozesses. Dieser Prozess wird bei einer Tumorprogression inhibiert durch eine Überexpression von Telomerase. Bei einer HPV-Infektion kommt es zu einer Interaktion von E6 und E7 mit hTERT, dem Enzym, das die Chromosomenenden stabilisiert und damit unendliche Replikation ermöglicht.
5. Angiogenese Induktion („Angiogenesis Induction“) ist ein essenzieller Bestandteil einer Tumorprogression durch Anschluss an das Blutversorgungssystem des menschlichen Organismus. HPV ermöglicht über E6 und E7 eine veränderte Angiogenese über die Modulation von vascular endothelial growth factor (VEGF).
6. Aktivierung der Invasion und Metastasierung („Activation of Invasion and Metastasis“) durch die Induktion von EMT. Dieser Schritt gewährleistet eine Invasion und Anschluss an die Blutbahnen.

Beide, E6 und E7, haben Einfluss auf unkontrollierte Proliferation über die Deregulation von zellulären Kontrollmechanismen. Dabei hat E7 einen wichtigen Einfluss auf pRb und E6 auf die Aktivität von p53. Die Herabregulierung von p53 durch E6 mittels Ubiquitinierung und der Disinhibition von E2F durch E7 auf pRb wurde bereits in Abschnitt 1.5.2 beschrieben. Diese Deregulierung der zellulären Kontrolle der Proliferation und Apoptose hat HPV entwickelt, weil es sich in ausdifferenzierenden epithelialen Zellen vermehrt. Damit zwingt das Virus den Keratinozyten in einen Zellzyklus der sicherstellt, dass die DNA-Synthese – der Virus DNA – sichergestellt wird.

HPV16 E1^{E4}, E6^I und E1C

Bei hr-HPV E1^{E4}, E6^I und E1C handelt es sich um alternativ gespligte HPV mRNA. Deren Proteine spielen in produktiven (E1^{E4}) und bei der Transformation (E6^I, E1C) eine Rolle. Sie zeigten im Rahmen von Studien eine prognostische Bedeutung für das Vorliegen einer Dysplasie. (78) Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die Sequenzen E6^I und E1C stark hochreguliert und die Sequenz E1^{E4} herunterreguliert ist in schweren zervikalen Läsionen. (78) Alle Sequenzen geben daher Hinweise auf das Stadium

einer HPV-Infektion und können dabei ein Faktor für das Vorliegen einer zervikalen Läsion sein.

Survivin (BIRC5)

Survivin ist ein Protein, welches durch das Gen baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 (BIRC5) kodiert wird. Bei BIRC5 handelt es sich um einen Apoptose-Inhibitor, der für gewöhnlich durch p53 supprimiert wird. Physiologisch inhibiert es dabei die Kaspase Aktivierung, welche mit einer negativen Regulierung der Apoptose einhergeht. (79) Durch die von HPV verursachte p53-Degradation durch das Onkoprotein E6 kommt es zu einer Überexpression von BIRC5. Die Expression von BIRC5 steht damit in direktem Zusammenhang mit dem Vorliegen eines Zervixkarzinoms. (80)

TERT

Die Telomerase reverse transcriptase (TERT) ist in allen Tumoren erhöht exprimiert während der S Phase der Zellteilung. In HPV transformierten Tumorzellen wird TERT durch das HPV-Onkogen E6 aktiviert und somit eine natürliche Seneszenz der Zelle durch physiologische Verkürzung der Telomere verhindert. (81)

1.8.2 Tumorsuppressorgene

Wichtiger Ausgangspunkt für eine onkogene Transformation sind **Tumorsuppressorgene**. Dabei handelt es sich in erster Linie um Gene, die für Proteine kodieren, die eine wichtige Funktion bei der Zellzyklusregulation spielen. Bei Schädigung der DNA können sie eine Apoptose der Zelle einleiten, sodass eine mögliche Vervielfältigung von geschädigten Zellen verhindert wird. Bei einer falschen Regulation dieses Mechanismus kann es zu einer unkontrollierten Proliferation von Gewebezellen kommen.

p53

Ein wichtiger Vertreter dieser Klasse ist das **p53-Protein**. Die grundsätzliche Funktion von p53 besteht im Zellzyklusarrest infolge einer Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren wie p21 und apoptoseinduzierenden Proteinen. (82) Im Rahmen einer dysplastischen Zellveränderung an der Zervix kommt es zu einem proteosomalen Abbau von p53 Protein durch das virale HPV-Onkoprotein E6, wodurch die Zellzyklusinhibition ausgesetzt wird.

(83) Aktuell spielt p53 bei der Diagnose von Zervixdysplasien eine untergeordnete Rolle, da ein direkter Zusammenhang zwischen Expression von p53 und Dysplasiegrad bislang nicht belegbar ist.

p16^{ink4a}

Der Tumorsuppressor **p16^{ink4a}** spielt schon heute eine wichtige Rolle bei der Diagnose von Dysplasien der Zervix in der Zytologie und Histologie aufgrund der hohen Sensitivität von 92% und bei Spezifität von 81% für CIN2+ mittels einer immunhistochemischen Färbung. (84) Das Verfahren wird in der Regel als Kombination von p16 und Ki-67 angewendet (Dual stain). p16 ist Bestandteil der physiologischen Zellzykluskontrolle einer Zelle. Es reguliert den Übergang der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus. In einem funktionsfähigen Zellzyklus verhindert damit p16 die unkontrollierte Zellteilung nach einem verursachten Zellschaden über eine Inhibition von Cyclin D und Cyclin-dependent kinases (CDK). Diese sind physiologisch verantwortlich für die Phosphorylierung von Retinoblastom (Rb) und leiten damit die Abspaltung des Transkriptionsfaktors E2F ein. Somit unterdrückt p16 über die indirekte Blockierung von E2F den weiteren Ablauf des Zellzyklus. (85) In einer dysplastisch veränderten Zelle infolge einer HPV-Infektion wird dieser physiologische Ablauf von dem Onkogen E7 ausgesetzt. Dieses bewirkt eine Spaltung von Rb (E2F) . Folglich kommt es zu einer kompensatorischen Überexpression von p16, um eine weitere Zellteilung der Zelle zu verhindern. Eine hohe Expression von p16 ist damit ein Hinweis auf das Vorliegen einer hr-HPV-Infektion mit dysplastischen Zellveränderung und hoher Expression von E7. (86)

1.8.3 Proliferationsmarker

Die Geschwindigkeit der Zellteilung einer Zelle ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zu einigen Einflussfaktoren gehören unter anderem Wachstumsfaktoren und Hormone. Diese können über die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade die Proliferation einer Zelle beeinflussen. Erhöhte Proliferation ist per se kein Krankheitszeichen, kann jedoch in Abhängigkeit von dem untersuchten Gewebe Hinweis auf eine Fehlregulation der Zellteilung sein. Im Zusammenhang mit der Diagnose eines Zervixkarzinoms und dessen Vorstufen sind in der Literatur einige zentrale Proliferationsmarker beschrieben.

Ki-67

Bei diesem Proliferationsmarker handelt es sich um ein Protein, welches während des Zellzyklus in der G1, S, G2 und M-Phase exprimiert ist. Es wird hingegen in Zellen, die sich aktuell nicht in der Replikation befinden (G0-Phase), nicht exprimiert. (87) In der Immunhistochemie findet dieser Marker bereits seit vielen Jahren Anwendung – insbesondere auch bei der Untersuchung von Biopsien und Konisaten der Zervix meist in gemeinsamer Anwendung mit p16. Eine gemeinsame Expression von Ki-67 und p16 ist in einem gesunden Zellverband untypisch, weshalb eine solche Expression Hinweis auf eine HPV-induzierte dysplastische Zellveränderung ist. (88)

Stathmin-1

Stathmin-1, auch als Onkoprotein 18 bekannt, hat einen Einfluss auf die Stabilität des Zytoskellets einer Zelle. Es handelt sich bei Stathmin-1 um ein Mikrotubuli-destabilisierendes Protein. Dieses beeinflusst während der Mitose die Regulation der Proliferation der Keratinozyten. (89) Eine erhöhte Expression von Stathmin-1 konnte in einer Studie in 81,1% (120 von 148) von Zervixkarzinomen nachgewiesen werden. (90)

MCM2

Das Minichromosome Maintenance Protein 2 (MCM2) ist wichtig für die Aktivierung der Replikation von DNA. Immunhistochemisch ist MCM2 in den zervikalen Basalzellen lokalisiert. Die Expression von MCM2 ist dabei erhöht mit steigendem Progressionsgrad einer zervikalen Läsion. Am höchsten zeigt sich die Expression in Zervixkarzinomen. (91)

Topo2a

Wie der Name bereits impliziert, ist Topoisomerase II-alpha (Topo2a) in der Lage, die DNA-Topologie zu verändern. Sie wird daher zur Transkription, Replikation und Mitose benötigt. Studien konnten zeigen, dass eine Überexpression von Topo2a mit dem Vorliegen einer zervikalen Läsion korreliert. (92)

1.8.4 Marker der „squamocolumnar junction zone“ (SJZ)

Die Untersuchung der „squamocolumnar junction zone“ kommt in der Zervixkarzinomforschung eine besondere Bedeutung zu. In diesem Bereich zwischen ektozervikalen Plattenepithelzellen und endozervikalen Zylinderepithelzellen kommt es am häufigsten zu den in Abschnitt 1.2. beschriebenen dysplastischen Veränderungen (Abbildung 6). Eine genauere Untersuchung dieser Zone ergab die Detektion von speziellen Epithelzellen (squamocolumnar junction cells), die ein charakteristisches Biomarkerprofil aufweisen. Dieses umfasst folgende Marker: (93) Keratin 7 (**KRT7**), Anterior Gradient 2 (**AGR2**), Cluster Differentiation 63 (**CD63**), Matrix Metalloprotease 7 (**MMP7**) und Guanin-Desaminase (**GDA**) (94) (95)

Es konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen dieser fünf Biomarker mit dem Vorkommen von CIN2+ statistisch signifikant zusammenhängt. Die Marker der SJZ konnten dabei in 91,8% (89 von 97) der höhergradigen Läsionen (HSIL) nachgewiesen werden. (94)

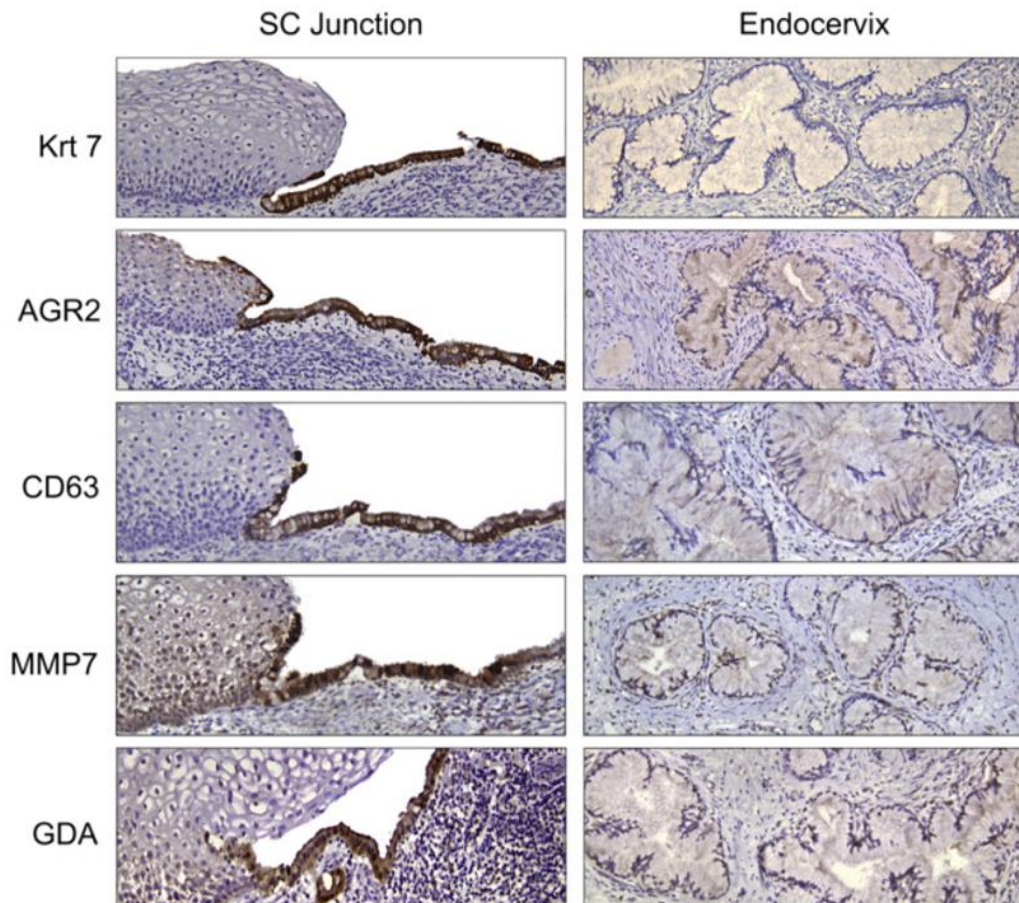
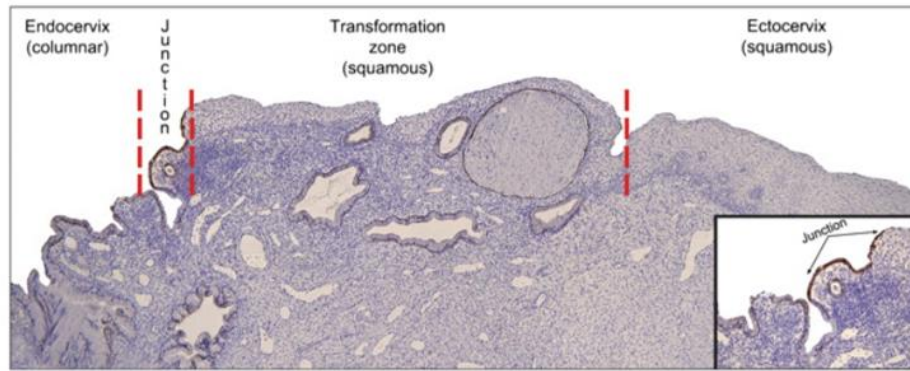


Abbildung 6 - Charakterisierung der Biomarker innerhalb der „squamocolumnar junction zone“ (SJZ) – National Cancer Institute – 2012 (95)

KRT7 = Keratin 7

AGR2 = Anterior Gradient 2

CD63 = Cluster Differentiation

MMP7 = Matrix Metalloprotease 7

GDA = Guanin-Desaminase

1.8.5 Stammzellmarker

p63

Bei p63 handelt es sich um einen embryonalen Transkriptionsfaktor von p53, welcher in myoepithelialen Zellen und Basalzellen der Zervix exprimiert ist. In CIN lässt sich eine erhöhte Expression von p63 nachweisen. Da p63 allerdings auch in gesteigerter Expression in Metaplasien oder tubulosquamösen Polypen vorliegt, kann er nicht als alleiniger Biomarker in der Detektion von zervikalen Dysplasien verwendet werden. (96) Es konnte jedoch gezeigt werden, dass p63 in physiologischen Zervikalzellen nur in den Basalzellen exprimiert wird, wohingegen es bei einem Zervixkarzinom über den gesamten Epithelverband verteilt exprimiert ist. In diesem Zusammenhang konnte auch eine Verbindung zwischen der Schwere einer Dysplasie und der Höhe der Expression von p63 bewiesen werden. (97)

KRT17

Keratin 17 (KRT17) ist ein embryonaler Stammzellmarker und Intermediärfilament des Zytoskeletts für die Bestimmung zervikaler Stammzellen. Diese Stammzellen sind Zielzellen der Infektion durch HPV und damit Ausgangspunkt der dysplastischen Veränderung. Eine Überexpression von Keratin 17 ist ein Indikator für einen schweren Verlauf eines Zervixkarzinoms. Es konnte gezeigt werden, dass eine KRT17 Expression signifikant mit einer zervikalen Läsion und Zervixkarzinomen korreliert. (98)

Tumorstammzellmarker (ALDH1A1, SOX2, NANOG, OCT4)

Für die Früherkennung von dysplastischen zervikalen Läsionen und Zervixkarzinomen konnten weitere Stammzellmarker als nutzbar identifiziert werden. Nanog homeobox (NANOG), POU class 5 homeobox 1 (OCT4), SRY-box 2 (SOX2) and ALDH family member A1 (ALDH1A1). (99) Während NANOG, OCT4 und SOX2 zentrale Steuerelemente von embryonalen Stammzellen sind und auch in Tumorstammzellen exprimiert werden, ist ALDH1A1 ein Marker für eine frühe Differenzierung der Stammzellen. Eine Studie zu diesem Biomarkerset konnte eine signifikant erhöhte Transkription aller genannten Biomarker in Proben von Zervixkarzinomen zeigen. Darüber hinaus konnte eine signifikant erhöhte Expression von ALDH1A1, OCT4 und NANOG in CINII-CINIII

Proben nachgewiesen werden. (99) Dies zeigt die Relevanz dieser Biomarker in der Detektion von zervikalen Läsionen und Zervixkarzinomen selbst.

1.8.6 Zellularitätsmarker

Für die Analysen mittels QG-MPH ist die Messung sogenannter Haushaltsgene (housekeeping genes) erforderlich. Sie ermöglichen eine Aussage über die Quantität der vorliegenden Zellmenge, die bei jedem Abstrich unterschiedlich sein kann. (100) Hierdurch ist eine Bewertung der relativen Ausprägung eines Biomarkers pro Zellzahl möglich. Für den QG-MPH werden hierzu die housekeeping Gene Actin- β (ACTB; Bestandteil des Zytoskellets) und Ubiquitin (UBC) als Zellularitätsmarker zur Relativierung und Normalisierung der Genexpressionswerte verwendet. (101)

1.9 Gesundheitsökonomische Aspekte zum Thema Gebärmutterhalskrebsscreening

Das Vorsorgeprogramm Gebärmutterhalskrebsscreening dient dem zentralen Ziel einer frühzeitigen Erkennung von behandlungsbedürftigen prämaligen Dysplasien CIN2 oder höhergradig (CIN2+), die in den allermeisten Fällen dann wenig invasiv und auch kostengünstig behandelt werden kann. Von einer effektiven Früherkennung profitieren zuallererst die einzelnen Patientinnen, die keine Krebserkrankung und damit keine schmerzhaften, langwierigen und zeitaufwändigen operativen Eingriffe oder Therapien ertragen müssen. Diese haben einen großen Einfluss auf die Lebensqualität und häufig auch auf die Fertilität der Patientin. Darüber hinaus profitiert auch die Krankenversicherung als ökonomischer Kostenträger von einer entsprechenden Früherkennung massiv, da so teure Krankenhausaufenthalte, Operationen, Rehabilitationsmaßnahmen etc. vermieden werden können. Davon abgesehen ist ein effektives Früherkennungsprogramm auch ein volkswirtschaftlicher Positivfaktor, da eine betroffene Patientin nicht aus dem Erwerbsleben ausscheidet, sondern für die Behandlung einer Krebsvorstufe im Normalfall nur maximal wenige Tage oder Wochen ausfällt.

Es zeigt, dass alle beteiligten Parteien von einem effektiven Früherkennungsprogramm profitieren. Es ist daher zunächst relevant zu diskutieren nach welchen Kriterien ein solcher Algorithmus am besten etabliert werden sollte. Die ökonomische

Nutzenmaximierungstheorie soll bei diesen Überlegungen leiten und einen verlässlichen Rahmen für die Ausgestaltung eines effektiven Modells geben. Demnach strebt ein effektives Modell nach der Nutzenmaximierung aller betroffenen Akteure. Ein solches Modell mit verschiedenen Nutzenmaximierungsfunktionen ist sehr komplex und nicht einfach zu etablieren. Hinzu kommt die Tatsache, dass sich mehrere Interessen gegenseitig ausschließen bzw. unterschiedliche Ziele der Akteure vorhanden sind. Dies gilt es bei den Überlegungen zu berücksichtigen und hierzu einige Modellvorschläge auszuarbeiten.

Für die Ausarbeitung eines entsprechenden Modells sind folgende grundlegende Überlegungen und Dimensionen wichtig.

- Medizinischer Nutzen und Evidenz (Leitlinie)
- Akkuratheit und Effektivität
- Überdiagnostik und Schaden für Patientin und Gesundheitssystem
- Kosten-Nutzen Verhältnis

Anhand dieser Dimensionen soll eine Kostenkalkulation und Modellrechnung für das aktuelle Gebärmutterhalskrebscreening in Deutschland gemacht werden und zusätzlich ein alternatives Screeningmodell mittels QG-MPH evaluiert werden.

2 Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

2020 war ein Jahr mit großen Veränderungen in der gynäkologischen Versorgung in Deutschland. Die Einführung der Zytologie und HPV Co-Testung stellt einen großen Umbruch dar. Es ist ein erster Kompromiss nach einer langen Diskussion zwischen den verschiedenen Interessensparteien. Nun muss evaluiert werden, ob die Einführung des neuen Algorithmus tatsächlich die gewünschten Ergebnisse liefert. Erste Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass zwar die Sensitivität im ersten Jahr für die Detektion von CIN2+ erhöht werden konnte – jedoch auf Kosten einer gesunkenen Spezifität. Infolge dieser gesunkenen Spezifität kommt es zu Überdiagnostik und Übertherapie. Die Einbestellung und Durchführung von unnötigen Kolposkopien, von Biopsieentnahmen und möglicherweise weiterer invasiver Schritte könnte durch eine höhere Spezifität verhindert werden.

In diesem Zusammenhang könnte der an der Charité neu entwickelte Test, QG-MPH Assay, Abhilfe schaffen. Dieser Test soll direkt Aufschluss über den Schweregrad einer Läsion geben mithilfe der Detektion verschiedener Biomarker (Abschnitt 1.8). Damit soll eine verbesserte Spezifität erreicht werden und etwaige Überdiagnostik und Therapie verhindert werden.

2.1 Zielsetzung

Um die Effektivität des QG-MPH unter Beweis zu stellen, soll diese Arbeit erste Anhaltspunkte liefern. Als Teil der FACTS-Studie wurden an 162 Patientinnenabstrichen der QG-MPH mit fünf etablierten und leitlinienkonformen HPV-Tests verglichen. Entscheidender Endpunkt bei der Betrachtung einer Patientenprobe war dabei die endgültige Histologie. Betrachtet und verglichen wurden für den klinischen Schwellenwert CIN2+ die positiven/negativen Proben. Es sollte hierzu untersucht werden, wie der QG-MPH im Vergleich zu den anderen HPV-Tests abschneidet.

In einem zweiten Teil der Dissertation sollte analysiert werden, welche gesundheitsökonomischen Gesamtkosten das neu etablierte Co-Testing Modell in Deutschland verursacht und welche etwaigen Kosteneinsparungen ein Screening-Modell mit dem QG-MPH Assay hätte.

2.2 Hypothesen

Folgende Hypothesen sollen im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet werden:

- Der QG-MPH bietet eine gute Übereinstimmung und Akkuratheit (d.h. Sensitivitäts- und Spezifität) im Vergleich zu konventionellen, leitlinienkonformen HPV-Tests zur Detektion von CIN2+.
- Mit dem QG-MPH kann eine bessere Spezifität als mit den leitlinienkonformen HPV-Vergleichstests erreicht werden.
- Der QG-MPH erkennt gleich viele hochgradige Dysplasien (CIN2+) wie die leitlinienkonformen HPV-Tests.

- Ein Früherkennungsprogramm mittels QG-MPH bietet gesundheitsökonomische Vorteile gegenüber einem Zytologie- oder HPV-basierten Screening mittels Co-Testung.

3 Material & Methodik

3.1 Studienpopulation & Rekrutierung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der FACTS-Studie (Feasibility and Acceptability of a Cervical HPV and Dysplasia Screening Test using Self-Sampling) (2019-2022) erstellt. Im Zusammenhang mit dieser Studie wurde im Vorfeld ein Votum durch die Ethikkommission eingeholt. Demnach ist eine Verwendung von Restmaterial von Zervikalabstrichen, die für einen diagnostischen HPV-Test entnommen wurden, für wissenschaftliche Zwecke zulässig (Nummer des Votums: Charité Universitätsmedizin Berlin, EA2/205/19 vom 8. Januar 2020).

Die FACTS-Studie wurde als Triagierungsstudie angelegt, um die Qualität des QG-MPH assays für die verbesserte Diagnostik uneindeutiger Befunde im Vergleich zu den histologischen Untersuchungsergebnissen zu bestimmen. Sie wurde mit Hilfe von Fördergeldern des SPARK-BIH Validation Fund 2 finanziert. Durchgeführt wurde sie von der AG Kaufmann, HPV-Labor der Forschungslabore der Klinik für Gynäkologie am Standort CVK der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Die Proben wurden über Dysplasiesprechstunden in gynäkologischen Praxen, Kliniken und MVZs von mehreren Standorten deutschlandweit rekrutiert. Dabei wurden zervikale Abstriche von den Patientinnen durch Ärztinnen und Ärzte der jeweiligen Dysplasiesprechstunde entnommen. Die Abnahme des Patientenmaterials wurde mittels Cervex-Brush® (Rovers Medical Devices, Oss, Niederlande) durchgeführt und in PreserveCyt Puffer in einem ThinPrep Dünnschichtgefäß fixiert. Das Volumen war 20 ml ThinPrep® PreservCyt®-Medium (Hologic, Inc.; USA).

Darüber hinaus haben die Patientinnen einen Anamnesebogen zu Risikofaktoren und persönlichen Angaben ausgefüllt und gemeinsam mit einer Self-sampling Probe (Evalyn

Brush, Rovers Medical Devices) diese Daten postalisch an das Labor übermittelt. Es sollte in diesem Zusammenhang geklärt werden, ob durch eine eigene Probenabnahme (Self-sampling) eine vergleichbare entsprechende Analyse durch QG-MPH Test möglich ist. Beide Proben (ärztlich abgenommener Zervikalabstrich und self-sampling Probe) wurden im Anschluss im Labor mittels PCR-basiertem Standard HPV Test (Multiplexed Genotyping) und innovativem QG-MPH Test untersucht. Die Untersuchungsergebnisse dieser Tests wurden dem Arzt bzw. der Ärztin und der Patientin postalisch übermittelt. Drei Monate nach Fertigstellung der Testergebnisse wurde die Beantwortung von Studienfragebögen zur weitergehenden Versorgung und dem aktuellen Stand der Behandlung sowie zur Einschätzung des self-sampling von der Patientin erbeten.

Für die Teilnahme an der Studie wurden im Vorfeld verschiedene Kriterien festgelegt.

Einschlusskriterien:

- Mindestalter 20 Jahre
- Vorliegen auffälliger Befunde oder keine Teilnahme am Screening seit 5 Jahren
- Unterschriebene schriftliche Einwilligungserklärung

Ausschlusskriterien:

- Personen, die nicht selbstständig einwilligen können
- Schwangerschaft
- Frauen nach Hysterektomie

3.2 Probenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von Studienteilnehmerinnen der FACTS-Studie verwendet (siehe Abschnitt 3.1). Für die Analysen im Rahmen dieser Dissertation wurde dabei Restmaterial von ärztlichen zervikalen Abstrichen von insgesamt 162 Teilnehmerinnen der FACTS-Studie verwendet. Weitere Untersuchungen oder Probengewinnung der Patientinnen sind nicht erfolgt. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde auf Angaben der Dysplasieeinheiten zu den Vorbefunden und finalen Histologien der Patientinnen zurückgegriffen. Ausnahmslos alle Teilnehmerinnen haben der Verwendung dieser Informationen im Vorfeld schriftlich zugestimmt.

Die FACTS-Studie umfasst die Messung sämtlicher Proben mit dem neu entwickelten QG-MPH Test. Dieser beinhaltet sowohl eine Bestimmung des HPV-Genotyps, als auch mehrerer zellulärer Biomarker, welche unter Berücksichtigung der gemessenen Biomarkerexpression einen Risikoscore für das Vorliegen einer zervikalen Dysplasie und dessen Stadium Aufschluss geben sollen. Dies erfolgt mittels E7 Onkogenexpression von 18 relevanten hr-HPV Genotypen in Kombination mit dem quantitativen Nachweis von relevanten zellulären Biomarkern. Diese Methode beruht auf dem im Jahr 2020 angemeldeten Patent WO 2020/161285 A1 (Erfinder: Andreas M. Kaufmann).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der HPV-Status von jeder Probe im QG-MPH bestimmt. Für einen Vergleich wurden im Folgenden die Proben mit fünf weiteren HPV-Tests verglichen. Bei den Vergleichstests handelt es sich um validierte, weit verbreitete Tests, die Leitlinienkonformität und eine adäquate klinische Sensitivität und Spezifität nachgewiesen haben (AWMF Registernummer 015/027OL). Als Goldstandard wurde eine HPV-Typisierung mittels Multiplex-Genotyping (MPG) durchgeführt, der ein sehr gut validierter PCR-basierter HPV Test mit analytischer Sensitivität ist. Es handelt sich dabei um einen inhouse Test beruhend auf einer GP5+/GP6+ primer PCR und einem Luminex-basierten Genotypisierungsschritt. (102) Der Test zählt wie der Hybrid Capture II auf Grund seiner sehr guten klinischen Validierung als Goldstandardtest. Die vorliegende Arbeit vergleicht die Qualität des QG-MPH mit der Performance der durchgeführten HPV-Tests. Für den Vergleich kamen die folgenden HPV-Tests zum Einsatz:

- Hybrid Capture II (HC2, Qiagen, Venlo; Niederlande)
- BD Onclarity® HPV Assay (Becton, Dickinson and Company, New Jersey; USA)
- Hologic Aptima® HPV Assay (Hologic Inc., Massachusetts; USA)
- Roche Cobas® HPV (Roche Holding AG, Basel; Schweiz)
- Seegene Anyplex II HPV HR (Seegene Inc., Seoul; Südkorea)

Damit eine Probe in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, mussten folgende Kriterien erfüllt werden:

- Ausreichend Restmaterial in der ThinPrep® Probe der Patientin (>5ml)
- erfolgreiche Messung von Actin B (ACTB) als Qualitätsmarker der Probe im QG-MPH

- Entnahme einer Biopsie in der Dysplasiesprechstunde oder eine definitive Histologie aus einer Konisation und Vorliegen eines histologischen Ergebnisses
- Verwertbares Ergebnis in der Luminex-Messung

Für einen aussagekräftigen Vergleich der verschiedenen Tests sollte ein repräsentatives Probenspektrum ausgewählt werden. Eine im Vorfeld errechnete Fallzahlplanung ergab eine Probenanzahl von 25 Proben je Kategorie. Für die Kategorie Cervicitis wurden extra weitere 25 Proben eingeschlossen. Hiervon zeigten sich 9 Proben HPV negativ und 15 Proben HPV positiv. Insgesamt wurden acht Kategorien definiert siehe Tabelle 6. Zudem wurde der Einschluss aller Karzinome (n=9) im FACTS-Kollektiv festgelegt. Die Proben wurden anhand der Ergebnisse des MPG HPV-Tests und der vorliegenden histologischen Ergebnisse ausgewählt. Final wurden folgende Proben für die Arbeit ausgewählt:

Tabelle 6 - Probenübersicht nach HPV-Ergebnis und Histologie

| | |
|-------------------|---|
| 24 Proben | HPV negativ; keine Dysplasie |
| 28 Proben | HPV positiv; keine Dysplasie |
| 9 Proben | HPV negativ; Cervicitis; keine Dysplasie |
| 15 Proben | HPV positiv; Cervicitis; keine Dysplasie |
| 23 Proben | CIN 1 |
| 21 Proben | CIN 2 |
| 33 Proben | CIN 3 |
| 9 Proben | Karzinome (davon 6 zervikale Plattenepithelkarzinome + 3 weitere Karzinome) |
| 162 Proben | Gesamtanzahl |

Alle Proben der Patientinnen wurden für die Studie in einem 20 ml ThinPrep® PreservCyt®-Medium (Hologic Inc.; Marlborough, Massachusetts, USA) fixiert. Abgenommen wurden die Proben von Ärztinnen und Ärzten aus zertifizierten Dysplasiesprechstunden und Dysplasieeinheiten deutschlandweit. Im Anschluss wurden die Proben per Post an das Institut für gynäkologische Tumorummunologie der Charité übersendet. Die Self-sampling Abstriche, welche im Rahmen der FACTS-Studie zusätzlich verwendet wurden, sind nicht im Rahmen dieser Arbeit genutzt worden.

Für die weitere Verwendung der Patientenprobe wurde aus dem ThinPrep®-Medium eine Menge von 2 ml abpipettiert und in ein Eppendorf®-Tube 2,2 ml überführt. Das Tube wurde anschließend 15 Minuten bei 15.000 RPM zentrifugiert. Der Überstand der Probe wurde anschließend abgekippt. Das zurückbleibende Zellpellet wurde dann mit 100 µl Diluted (1:3) Working Lysis Mixture (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA) gemischt. Das Lysis Mixture dient dem Proteinverdau mittels Proteinase K womit nach Aufbruch der Zelle die RNA zugänglich wird. Nach ca. 5 Sekunden Schütteln durch einen Vortexmischer war das Zellpellet in der Diluted Working Lysis Mixture resuspendiert und die Probe zur Lyse für 30 min bei 50°C und 650 Umdrehungen/min im Thermoschüttler (Thermomix comfort - Eppendorf (Hamburg, D) inkubiert. Die so gebildeten Zelllysate wurden bis zur Messung bei -80°C gelagert. Für die Diagnostik und Durchführung des QG-MPH wurde das wie beschrieben hergestellte Zelllysate verwendet. Für MPG und Seegene Anyplex II HPV wurde das AID Bacterial Lysis und neutralization buffer verwendet. Dieses Verfahren ist ähnlich zu dem Working Lysis Mix von ThermoFisher und macht die RNA mittels Proteinase K zugänglich. Für die Probenanalyse mit BD Onclarity®, Qiagen HCII und Aptima® RNA-HPV wurden jeweils die entsprechenden ThinPrep® PreservCyt®-Medien verwendet. An ThinPrep® Lösung wurde die testspezifische Menge eingesetzt. In diesem Zusammenhang kann es zu Unterschieden in der Zellmenge und der dysplastischen HPV-positiven Zellzahl und damit der Sensitivität des Tests bzw. des Ergebnisses kommen.

3.3 Angewendete Tests für den HPV-Nachweis

Im Folgenden sollen die durchgeführten Tests im Rahmen dieser Arbeit detailliert beschrieben werden. Jeder Test wird in seiner theoretischen Funktionsweise und praktischen Durchführung beschrieben.

3.3.1 QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology Assay (QG-MPH)

Die neu entwickelte Testmethode QG-MPH aus dem gynäkologischen Labor für Tumorimmunologie zur Detektion von Zervixkarzinomen und dessen Vorstufen basiert auf einer Testplattform deren Patentrechte bei der Firma ThermoFisher Inc. (Massachusetts; USA) gesichert sind. Es handelt sich dabei um einen Multiplex-Assay (bis 82

Zielstrukturen gleichzeitig), der auf der Verwendung von einzelnen farbcodierten Luminex-Beadklassen basiert. Anders als bei der vielfach verbreiteten Technologie der PCR zur Detektion von HPV DNA, basiert der QG-MPH auf einem mRNA „capture & signal amplification“-Prinzip. Dabei handelt es sich um eine Signalamplifikation, die proportional zur bead-gebundenen Menge an spezifischen RNA-Sequenzen ist, ohne dass hierzu eine Vervielfältigung der Ursprungssequenz nötig ist. Damit ermöglicht dieses Verfahren eine genaue Quantifizierung der gesuchten RNA-Zielsequenzen. Zur Messung werden die Proben nach Capture-Hybridisierung und Anfärbung der gebundenen RNAs an den spezifischen Bead-Klassen zur Bestimmung der Mean Fluorescence Intensity (MFI) in einem Luminex®-Reader (Bioplex 200, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules USA) evaluiert. Abbildung 7 zeigt den Testablauf und die Funktion.

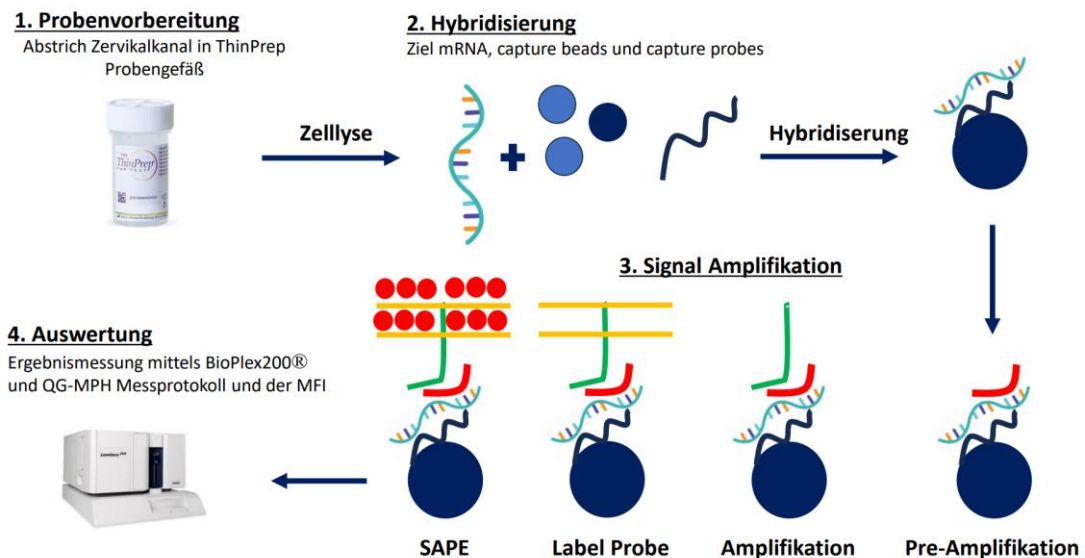


Abbildung 7 - Funktionsprinzip des QG-MPH Assays – modifiziert nach Skof et al. (103)

Präanalytisch wird die Patientenprobe (hier Zervixabstrich) abzentrifugiert und das Zellpellet mittels eines Lysepuffers (proprietär) mit Detergens und Proteinase K für 30 min bei 56°C inkubiert und die RNA freigesetzt und stabilisiert. Im nächsten Schritt werden die Luminex® Capture-Beads (magnetisch und farbcodiert) zu der Patientenprobe hinzugegeben. Diese binden an die Zielstruktur der gesuchten mRNA-Sequenz. Dieser Schritt entspricht der Hybridisierung und beschreibt die xMap® Methode („multi-analyte profiling beads“). Gleichzeitig erfolgt die Zugabe des „probe set“, welches die komplementären spezifischen DNA Probensequenzoligonukleotide enthält. Diese bilden einen

Doppelstrang mit der Ziel-RNA, welche an die spezifischen capture-probe Sequenzen an der Bead-oberfläche gebunden ist. Während einer 18-22 h Inkubation werden die spezifischen mRNAs gebunden und damit auch aufgereinigt und konzentriert.

An Tag 2 erfolgt dann die eigentliche Amplifikation des Signals mittels bDNA Technik (branched DNA). Label extenders binden in diesem Schritt an die Ziel-RNA und ermöglichen die Bindung der bDNA Sequenzen wodurch eine ca. 400 fache Signalamplifikation erfolgt. Durch die mehrfachen Verbindungsstellen einer entsprechenden Einheit aus Capture beads und label extenders spricht man auch von einer branched amplification. An die freien Biotin-Bindungsstellen der label extenders bindet im Anschluss das fluoreszierende Streptavidin-konjugierte R-Phycoerythrin (SAPE). Die fluoreszierende Farbstoffintensität wird in einem letzten Schritt mittels Luminex®-Reader gemessen und als die MFI einer Messung von mindestens 30 Beads einer Bead-Klasse ausgegeben. Abbildung 8 zeigt das Funktionsprinzip des QG-MPH Assays.

Dieses Prinzip findet lediglich im Aptima® HPV-Assay von Hologic wieder, der auch auf die Detektion von RNA setzt. Auch handelt es sich bei den Vergleichstests allesamt um PCR-basierte Assays, bis auf den Aptima® HPV-Assay, der auf Transcription-mediated amplification (TMA) beruht. Einzig der HCII und der QG-MPH unterscheiden sich hier durch Verwendung eines Hybridisierungsverfahrens, das keine target Amplifikation beinhaltet. Im QG-MPH findet man das Alleinstellungsmerkmal einer quantitativen Auswertung der einzelnen gemessenen mRNA Klassen.

Die einzelnen Ziel-mRNAs des QG-MPH sind im Folgenden in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7 - Messparameter des QG-MPH

| Biologischer Messparameter | Zielstruktur |
|-----------------------------------|--|
| High-risk HPV (E7) | HPV 16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,73,82 |
| Low-risk HPV (E7) | HPV 6 |
| Zellularität (int. Kontrolle) | Aktin-beta (ACTB); Ubiquitin (UBC) |
| Tumormarker | BIRC5 (Survivin), TERT |
| HPV RNA Splicemarker | HPV16 E1^E4, E6*1, E1C |
| Tumorsuppressormarker | p53, p16 |

| | |
|--|--|
| Proliferationsmarker | Stathmin, Ki-67, MCM2, Topo2alpha |
| Squamocolumnar junction zone – Biomarker | KRT7, MMP7, GDA, CD63, AGR2 |
| Stammzellmarker | P63, KRT17, ALDH1A1, SOX2, NANOG, POU5F1 (OCT4), |

3.3.1.1 QG-MPH Assay – praktische Durchführung

Die Durchführung des QG-MPH gliedert sich in drei unterschiedliche Teilschritte. Diese sind Lysatherstellung, Capture-Hybridisierung, Anfärbung durch bDNA und die Messung am Luminex. In einem ersten Schritt werden zunächst die notwendigen Zelllysate aus den ThinPrep® Medien gewonnen (siehe 3.3). Im Anschluss dauert die Durchführung der Teilschritte des QG-MPH zwei Tage.

Tag 1 – Hybridisierung

Die notwendigen Materialien für die Hybridisierung sind in Tabelle 7 aufgeführt. Als erstes werden Blocking Reagent, Proteinase K und Probe Set aufgetaut und die zuvor hergestellten Zelllysate auf Raumtemperatur gebracht. Die Lysis Mixture wird für rund 30 min mittels Wärmebad auf 37°C erwärmt und der Thermoshaker auf 54°C erhitzt. Im nächsten Schritt werden dann die aufgetauten Zelllysate in ein Well (Microplate, 96 Well, PS, Chimney Well – Greiner BioOne) pipettiert – jeweils 20 µl. Separat wird in 3 weiteren Wells die Negativkontrollen bestehend aus zwei Teilen RNase-freiem Wasser und einem Teil Lysis Mix Konzentrat ergänzt, sowie separat die Positivkontrolle CaSki Lysat.

Anschließend wird der Working bead mix angesetzt, welcher sich aus den folgenden Bestandteilen zusammensetzt (Tabelle 8). Von dem angesetzten working bead pre-Mix wird anschließend 5 µl zu jedem vorgelegten Lysat hinzugegeben.

Tabelle 8 - Zusammensetzung Working bead mix pro Probe

| | |
|----------------------------|----------------|
| RNase-freies Wasser | 1,30 µl |
| Lysis Mixture | 1,65 µl |
| Blocking Reagent | 0,50 µl |
| Proteinase K | 0,05 µl |
| Probe Set | 1,25 µl |
| Capture Beads | 0,25 µl |
| Gesamtmenge je Well | 5,00 µl |

Nachdem der working bead mix dem Well mit der Probe zugefügt wurde, wird die gesamte Platte mit einer Spezialfolie (Hybridisationsplatte QuantiGene® Plex Assay 2.0, Affymetrix Inc.) abgeklebt. Diese dichtet die einzelnen wells zueinander ab und verschließt sie, damit über die Inkubationszeit keine Flüssigkeit verdampfen kann. Nachdem die Folie haftet wird die Platte mit allen Proben auf einem Thermoshaker (Thermoshaker, Migge/neoLab) über einen Zeitraum von 18-22 Stunden bei einer Temperatur von 54°C und bei 600 Umdrehungen pro Minute (rpm, engl. „rounds per minute“) inkubiert.

Tag 2 – Signalamplifikation und Messung

Der zweite Tag startet mit einem 30-minütigen Wärmebad, in dem der Pre-Amplifier auf eine Temperatur von 37°C erwärmt wird. Gleichzeitig wird die 96-Well-Platte für 1-2 Minuten bei 240 x g zentrifugiert, damit etwaige Kondenswassertropfen von der Innenseite der Folie abgelöst werden.

Der Waschpuffer für die weiteren Schritte wird nach Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9 - Zusammensetzung Waschpuffer Tag 2 für eine 96 Well Platte

| Reagenzien | Menge |
|-------------------------|---------|
| Wash Buffer Component 1 | 0,3 ml |
| Wash Buffer Component 2 | 5 ml |
| RNase-freies Wasser | 94,5 ml |

Die Proben werden im Anschluss mittels Multikanalpipette (Research plus – 8 Kanal, Eppendorf SE) fünf Mal auf- und abpipettiert und von der Hybridisierungsplatte

(Rundbogenplatte) auf eine magnetische Separationsplatte (Flachbodenplatte, Greiner Bio-One International AG, Österreich) übertragen.

Zu Beginn des Waschvorgangs wird die Platte zunächst für ca. 1 Minute auf dem Handheld Magnetic Plate Washer befestigt, die magnetischen Beads sammeln sich hierbei auf dem Boden der Platte. Der Überstand wird danach abgekippt und die Platte mehrfach auf einem Papiertuch ausgeklopft. Danach werden 100 µl Waschpuffer zu jeder einzelnen Probe gegeben und auf dem Thermoschüttler für rund 10 Sekunden vermengt, bevor die Platte im Anschluss wieder auf den Magnetic Plate Washer übertragen wird. Dieser Ablauf wird insgesamt drei Mal bei jedem Waschvorgang wiederholt.

Nach erfolgtem ersten Waschvorgang beginnt die Hybridisierung mittels Pre-Amplifier. Hierzu wird je 50 µl davon zu jeder Probe zugegeben. Die gesamte Platte wird danach mit einer Spezialfolie aus Aluminium (Rotilabo®, Carl Roth GmbH & Co KG) versiegelt und im Thermoschüttler inkubiert (60 Minuten bei 50°C; die ersten zwei Minuten bei 800 rpm, danach 58 Minuten bei 600 rpm). Im Anschluss erfolgt ein weiterer Waschvorgang mit drei Wiederholungen (siehe vorheriger Absatz).

Als nächster Schritt erfolgt eine zweite Hybridisierung – diesmal mit 50 µl Amplifier. Die Schritte sind analog zur Hybridisierung mittels Pre-Amplifier (siehe vorheriger Absatz). Auch nach diesem Schritt erfolgt ein weiterer Waschvorgang analog zu den vorherigen.

Nach der Waschung erfolgt die dritte Hybridisierung – mittels 50 µl Label Probe. Die Hybridisierung erfolgt analog mit einem erneutem Waschvorgang.

Sobald die dritte Hybridisierung abgeschlossen ist, wird der SAPE Working Mix angesetzt. Hierzu werden 15 µl SAPE in 5 ml SAPE Diluent für eine gesamte Platte verdünnt und anschließend 10-15 Sekunden auf dem Vortexer vermengt. Je 50 µl werden von diesem SAPE Working Mix dann der einzelnen Probe zugegeben. Die Platte wird erneut mit der Spezialfolie aus Aluminium versiegelt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (2 min bei 800 rpm, anschließend 28 min bei 600 rpm). Auch hier erfolgt wieder ein dreimaliger Waschvorgang. Im Unterschied zu den vorherigen Waschungen wird bei diesem letzten Vorgang der SAPE Washing-buffer verwendet.

Zeitgleich mit dem Ablauf dieser letzten Inkubation wird der Bioplex 200Reader (BioPlex® 200 System, BioRad Laboratories Inc.) für die Probenmessung gestartet und das entsprechende Messprotokoll der BioPlex-Software aufgerufen. Der BioPlex 200® startet mit einem Selbstreinigungsprogramm („wash between plates“) mittels 70% Isopropanol und Wasser. Gleichzeitig wird die Lasermesseinheit erwärmt. Nach Abschluss des letzten Waschvorgangs wird jedem einzelnen Well nochmals 110 µl SAPE Washing-buffer zugegeben und durch auf- und abpipettieren mit der Probe vermischt und evtl. Aggregate vereinzelt. Hierdurch werden Aggregatbildungen, die zu falschen Messwerten führen, vermieden. Final folgt die Messung der Proben durch den BioPlex 200®Reader entsprechend der Herstellervorgaben.

3.3.1.2 QG-MPH-Assay – Material, Reagenzien und Geräte

Für die Durchführung des beschriebenen QuantiGene® 2.0 Plex Assay sind die in den folgenden Tabellen aufgestellten Materialien notwendig.

Tabelle 10 - Auflistung der Reagenzien des QuantiGene 2.0 Plex Assays

| Reagenzien | Hersteller |
|--|---|
| <i>Lysis Mixture</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Blocking Reagent</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Proteinase K</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Probe Set</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Capture Beads</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Amplifier Diluent</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Labelprobe Diluent</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>SAPE Diluent</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Wash Buffer n° 1</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Wash Buffer n° 2</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Pre-Amplifier</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Amplifier</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Label Probe</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Streptavidin-conjugated R-Phycoerythrin</i> | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |

Tabelle 11 - Auflistung der Reagenzien für das Luminex Durchflusszytometer

| Reagenzien | Hersteller |
|----------------------------|--|
| <i>RNase-freies Wasser</i> | Fresenius Kabi (Louviers, Frankreich) |
| <i>Sheath-Fluid</i> | BioRad Laboratories Inc. (Hercules, USA) |
| <i>NaOH 1 M</i> | Carl Roth GmbH Co. KG (KA, Deutschland) |
| <i>Isopropanol</i> | Carl Roth GmbH Co. KG (KA, Deutschland) |

Tabelle 12 - Auflistung der verwendeten Geräte

| Gerätetyp | Name | Firma |
|---|--|---|
| <i>Vortexmischer</i> | Vortex Genie 2 | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Wasserbad</i> | TW 8 | Julabo GmbH (Seelbach, Deutschland) |
| <i>Handheld Magnetic Plate Washer</i> | Bio – Plex | BioRad (Hercules, USA) |
| <i>Zentrifugen</i> | Heraeus Multifuge (3325 Rotor) | ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <i>Mini-Zentrifuge</i> | MiniSpin | Eppendorf (Hamburg, D) |
| <i>2 Platten-Zentrifuge</i> | PlateFuge | Benchmark Scientific (Edison, USA) |
| <i>Thermoschüttler (2 ml)</i> | Thermomix comfort | Eppendorf (Hamburg, D) |
| <i>Thermoshaker für Mikrotiterplatten</i> | neoLabLine Thermo Shaker | neoLab Migge GmbH (Heidelberg, D) |
| <i>Luminex® Reader</i> | BioPlex® 200 System | BioRad Laboratories Inc. (Hercules, USA) |
| <i>Kühl- und Gefrierschränke</i> | 4°C | Liebherr (Bulle, Schweiz) |
| | -20°C | Robert Bosch GmbH (D) |
| | -80°C | Robert Bosch GmbH (D) |
| <i>Pipetten</i> | Research plus – 0,5 -10 µl; 10µl; 10-100 µl; 100-1000 µl | Eppendorf (HH, Deutschland) |
| <i>Mehrkanal-Pipette</i> | Research plus – 8 Kanal; 0,5 – 10 µl; 30 – 300 µl | Eppendorf (HH, Deutschland) |

Tabelle 13 - Aufstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Name | Firma |
|--|---|---|
| <i>Pipettenspitzen</i> | Biosphere® Filter Tips 0,5-20 µl, 2-100 µl, 100-1000 µl | Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) |
| <i>96-Well-Platten</i> | Microplate, 96 Well, PS, Chimney Well, µClear®, schwarz | Greiner Bio-One International AG (Kremsmünster, Österreich) |
| | Hybridisationsplatte QuantiGene® 2.0 Plex Assay Kit | Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA) |
| <i>Versiegelungsfolien für 96-Well-Platten</i> | Rotilabo® - Abdeckfolien für PCR - Platten | Carl Roth GmbH Co. KG (KA, Deutschland) |
| | Pressure Seals QuantiGene® 2.0 Plex Assay Kit | Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA) |
| <i>Tubes</i> | Falcon® steril 50 ml | BD (Franklin Lakes, USA) |
| | Falcon® steril 15 ml | BD (Franklin Lakes, USA) |
| | 2 ml Safe Lock Tubes | Eppendorf (HH, Deutschland) |

3.3.2 MPG – Multiplexed Genotyping

Der Multiplexed Genotyping HPV Assay ist einer der zwei Goldstandard-HPV-Tests die in grossen klinischen Studien validiert wurden. Daher werden neuere HPV-Tests in Studien mit dem MPG verglichen, um mit einem wissenschaftlich sehr gut validierten Vergleichstest mit analytischer Sensitivität gegengetestet zu sein. Der Assay basiert auf einer HPV-DNA Amplifikation des L1 Gens durch PCR mittels des „general primer“ Paars GP5+/6+-bio. Diese degenerierten primer amplifizieren die L1-Sequenzen aller HPV Genotypen. Die anschließende Detektion der PCR Produkte erfolgt mittels Genotyp-spezifischer Probensequenzen, die an Luminex-beads gekoppelt sind. Der Biotin-markierte GP6+-bio primer dient der Anfärbung der PCR Produkte mittels SAPE. Die fluoreszenzfarbkodierten Luminex-beads und die daran gebundene PE-Fluoreszenz wird mit dem BioPlex 200® gemessen.

Die Zielregion des MPG -Assay ist die L1-Region des jeweiligen HPV-Typen. Insgesamt umfasst der Assay 14 einzelne high-risk HPV-Typen, die jeweils als Einzelergebnisse ausgewiesen werden (HPV16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68). Zudem werden 4 als potentiell karzinogen klassifizierte high-risk HPV-Typen detektiert (Typ HPV26,53,73,82), sowie weitere 9 low-risk HPV-Typen (Typ 6,11,42,43,54,57,70,72,90). Der Test beinhaltet eine beta-globin Gen PCR-Bestimmung als interne Probenkontrolle

für humanes Material. Die Zielsequenzen umfassen ca. 150 Nukleotide lange Genfragmente.

Für den MPG gibt es derzeit keine automatisierte Gerätelösung zur Abarbeitung der einzelnen HPV-Proben. Folglich erfolgte die Durchführung des Assay per Hand entsprechend der Durchführung einer PCR-Amplifikation mit nachfolgender reversen Hybridisierung an Genotypisierungssonden.

3.3.3 Seegene Anyplex II HPV (Seegene Inc.)

Bei dem Anyplex II HPV Detection Assay handelt es sich um einen multiplex-PCR Assay mit umfassender Einzelgenotypisierung. Der High-risk 14 HPV Assay umfasst die Typen HPV16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68. Alle HPV-Typen werden dabei jeweils als Einzelergebnis separat ausgewiesen.

Der Anyplex Assay verwendet die sogenannte TOCE-Technologie („tagging oligonucleotide cleavage and extension“). Die hierzu genutzten Komponenten sind DPO („dual priming oligonucleotide primer“) Pitcher („tagging oligonucleotide“) und Catcher („fluorescently labeled artificial template with a sequence complementary to the tagging portion of Pitcher“).

Für die Auswertung wird die Anyplex-Software genutzt, mit dem real time PCR Gerät CFX96 (BioRad). Aktuell gibt es für den Anyplex II HPV-Assay einen Automaten für die vereinfachte Abarbeitung der Proben. Dieser war zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch nicht auf dem Markt verfügbar. Aus diesem Grund wurden die Proben im Rahmen dieser Arbeit händisch abgearbeitet und analysiert.

3.3.4 BD Onclarity® HPV-Assay (Becton Dickinson and Company Inc.)

Der Onclarity® HPV-Assay ist neben dem Roche Cobas® und Hologic Aptima einer der am meisten durchgeführten HPV-Tests weltweit. Im Gegensatz zu den anderen beiden Hochdurchsatz HPV-Assays bietet der BD Onclarity® die größte Bandbreite für die Genotypisierung einzelner HPV-Typen.

Der Assay umfasst die jeweilige Einzeltypisierung von den HPV Typen 16,18,31,45,51,52. Zudem gibt es noch eine Typisierung von drei weiteren Sonden. P1

umfasst die HPV Typen 33 und 58. P2 umfasst HPV Typ 35,39 und 68. P3 umfasst HPV Typ 56,59 und 66 die als kumuliertes Ergebnis ausgegeben werden. (siehe Abbildung 8).

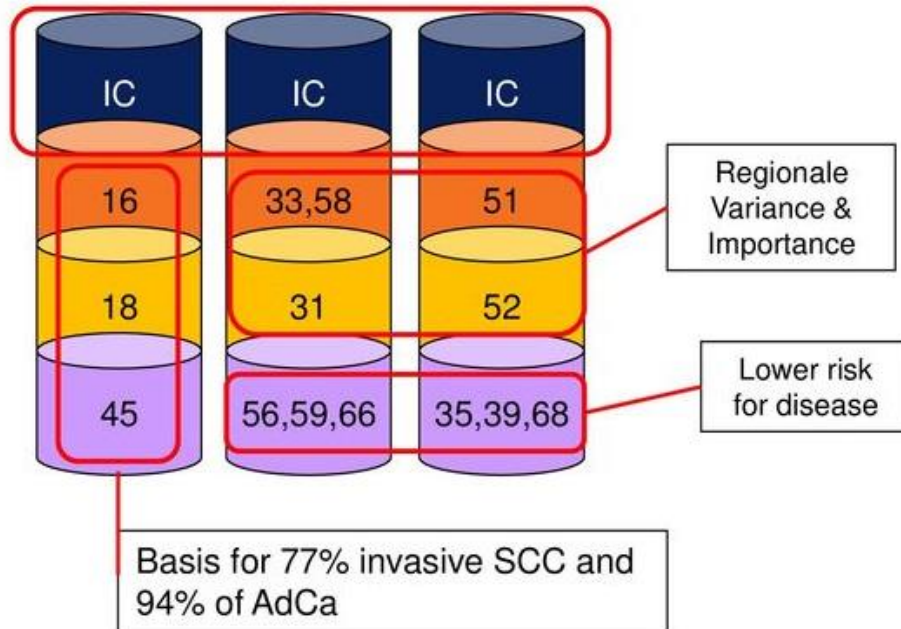


Abbildung 8 - BD Onclarity HPV-Assay. IC = internal control, SCC = squamous cell carcinoma, AdCa = adenocarcinoma, - modifiziert – Quelle BD 08.2022 (135)

Zielregion des HPV-Assays ist die E6/E7 Region des Virus und basiert auf einer Real-Time PCR (DNA). Das Testprinzip folgt den zweiteiligen Stufen einer regulären PCR. Im ersten Schritt erfolgt die automatisierte (mittels BD Viper LT® oder BD COR®) Probenvorbereitung und Homogenisierung der Zellen und Extraktion von DNA. In einem zweiten Schritt erfolgt dann die Amplifikation mittels PCR der Ziel-DNA-Sequenzen unter Verwendung von Primern und fluoreszenzmarkierten Detektionsproben für die HPV-Zielsequenz und die interne Kontrolle beta-globin.

BD bietet zwei verschiedene HPV-Vollautomaten an. Für kleinere (Viper LT®) und Großlabore (BD COR®). Beide Automaten arbeiten dabei nach dem identischen Prinzip. Der BD Viper LT® wurde im Jahr 2018 auf den Markt gebracht und war die erste vollautomatisierte PCR-Lösung von BD. Diese Lösung beinhaltet die gleichzeitige

Abarbeitung von 30 Proben mit einer direkten hands-on-time von 10 Minuten. Dies beinhaltet die Probenvorbereitung auf dem Gerät, sowie die Auffüllung der nötigen Reagenzien auf dem Gerät. Der Viper LT® verfügt über eine bidirektionale LIS-Schnittstelle. Der Output dieser automatisierten PCR-Lösung liegt bei maximal 120 Proben pro Tag



Abbildung 9 - BD Viper LT® System – Quelle BD 08.2022

Der BD COR® wurde erstmals im Jahr 2020 in Europa vorgestellt und ist seitdem auf dem Markt etabliert. Das System basiert auf dem BD Viper® und verfügt über zwei Systemmodule. Das GX-Modul ist mit doppelter Probenkapazität wie ein Viper LT® ausgestattet. Das PX-Modul sorgt für den komplett automatisierten Prozessablauf der PCR. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten HPV-Tests wurden auf einem BD COR® durchgeführt. Dieses Gerät hat eine maximale Kapazität von ca. 500 Proben/ Tag.



Abbildung 10 – BD COR® - Quelle BD 08.2022

3.3.5 Aptima® RNA HPV-Assay (Hologic Inc.)

Der Aptima HPV Assay ist ein RNA-basierter HPV-Test. Es erfolgt der Nachweis von mRNA der Onkogene E6 und E7. Das Kit umfasst insgesamt 14 Hochrisikotypen (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68) und ist damit analog zu BD Onclarity®, Roche Cobas® und Seegene High risk HPV 14. Nach positivem HPV-Nachweis erfolgt mittels Reflextestung eine spezifische Genotypisierung mittels Aptima HPV 16 18/45 Genotype Assay. HPV Typ 16 wird dabei separat genotypisiert und als Einzelergebnis ausgewiesen. Die Genotypen 18 und 45 werden in einer weiteren Sonde gemeinsam als Einzelergebnis ausgewiesen.

Das Testprinzip des HPV Assays beruht auf einer Hybridisierung, bei der durch magnetische Bindung von spezifischen Fänger-Oligomeren, unterschiedliche Target mRNA gebunden werden. Die dadurch entstandenen Capture-mRNA-Komplexe werden im Anschluss mittels eines Magneten an die Randfläche des Reaktionsgefäßes gebunden. Der restliche Überstand kann dadurch abpipettiert werden. Die so zurückbleibenden Komplexe werden danach durch TMA-Amplifikationsverfahren mittels T7 RNA/RNA Polymerase amplifiziert.

Die Firma Hologic ist seit mehreren Jahren mit dem vollautomatisierten HPV-Gerät Panther® (Modell Fusion oder Modell Plus) auf dem Markt vertreten. Dieses System arbeitet in der Praxis von der Bedienung seitens der am Gerät tätigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sehr ähnlich wie die vollautomatisierten Systeme von BD und Roche. Oberste Priorität hat dabei immer die maximale „walk-away time“ der Mitarbeiter, damit möglichst eine eigenständige Abarbeitung der Proben durch das Gerät garantiert ist.

ADD ON
PANTHER® PLUS



Abbildung 11 – Vollautomatisierungssystem HPV-Diagnostik Panther® - Quelle Hologic

Analog zu den anderen Vollautomaten müssen die Patientenproben zunächst mit einem eindeutig identifizierbaren Barcode versehen werden. Es ist dabei eine gesamte „hands-on-time“ von 33 Minuten für 192 Tests von Hologic beworben.

3.3.6 Roche Cobas® (Roche Holding AG)

Bei dem Roche Cobas® HPV-Test handelt es sich um einen PCR-basierten hr HPV-Test, der auf dem direkten DNA-Nachweis von 14 Hochrisikotypen basiert.

Das Testergebnis wird unterteilt in drei verschiedene Kategorien. HPV-Typ 16 und 18 werden dabei einzeln genotypisiert ausgegeben. Die anderen 12 Hochrisikotypen werden zusammen ausgewertet (31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68). Die Zielsequenz des Cobas® HPV-Test ist die L1-Region des Virus.

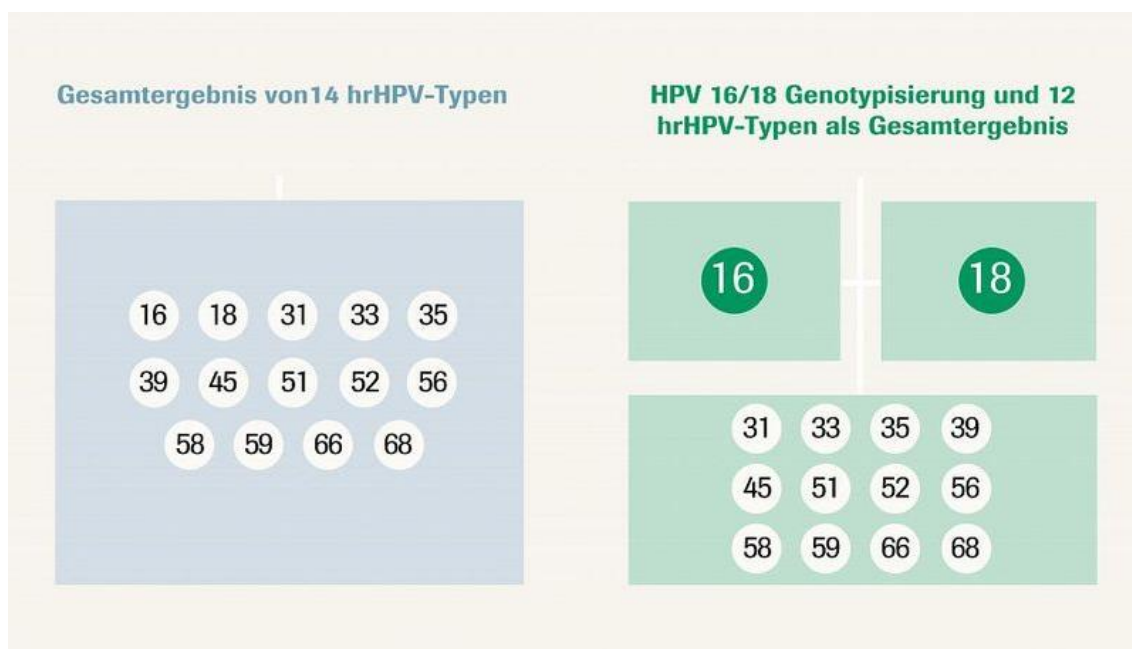


Abbildung 12– Virustypen Roche Cobas® - Quelle Roche 08.2022 (136)

Roche bietet den Cobas® HPV-Test als Kit für drei unterschiedliche PCR-Vollautomaten an, welche die einzelnen Proben komplett automatisiert abarbeiten und die Ergebnisse direkt über eine IT-Datenschnittstelle in das LIS (Laborinformationssystem) überspielen können.

Die drei Automaten sind Cobas®4800, Cobas®6800 und Cobas®8800 und unterscheiden

sich in der Menge an möglichen Proben-durchsatz. Ansonsten ist die grundlegende Technik dahinter identisch. Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proben wurden mit einem Cobas®6800 getestet. Die Cobas® Vollautomaten bieten dabei eine komplette Prozessautomatisierung an inklusive Nukle- insäureaufreinigung, Amplifikation und De- tektion mittels Real-Time PCR.



Abbildung 13 – Übersicht Vollautomatisierung HPV Roche Cobas® (137)

3.4 HPV-Tests – Vergleich der Parameter

Nach Beschreibung der verwendeten HPV-Tests und der Erklärung zur praktischen Durchführung folgt nun eine tabellarische Aufstellung der Testparameter im Vergleich. Die vier kommerziellen HPV-Tests (Seegene, BD, Hologic, Roche) weisen ein identisches Spektrum an beinhalteten HPV-Typen vor. QG-MPH und MPG können eine erweiterte Palette mit mehr HPV-Typen vorweisen.

Tabelle 14 - Verwendete HPV-Tests im Vergleich

| Test | HPV-Typen | Zielregion | Testmethode | Genotypisierung |
|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------|--|
| QG-MPH | 18 hr HPV-Typen + HPV 1r Typ 6 | E7 + <i>Biomarker</i> | Hybridisierung | Vollständige Genotypisierung |
| MPG | 18 hr HPV-Typen + 9 1r Typen | L1 – DNA | PCR | Vollständige Genotypisierung |
| Seegene Anyplex II | 14 hr HPV-Typen | L1 – DNA | PCR | Vollständige Genotypisierung |
| BD-Onclarity® HPV | 14 hr HPV-Typen | E6 / E7 DNA | PCR | Typ 16, 18, 31, 45, 51, 52 jeweils Einzelergebnis Sonde 1 – Typ 33, 58 S. 2 – Typ 56, 59, 66 S. 3 – 35, 39, 68 |
| Aptima® HPV | 14 hr HPV-Typen | E6 / E7 mRNA | TMA-Amplifikation | 16 als Einzelergebnis 18/45 eigene Sonde |
| Roche Cobas® HPV | 14 hr HPV-Typen | L1 DNA | PCR | Typ 16 und Typ 18 jeweils als Einzelergebnis |

Die verschiedenen HPV-Tests nutzen verschiedene Zielregionen des Virusgenoms zum diagnostischen Nachweis. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Gene der

Onkoproteine E6, E7 aber auch das Gen für das Viruskapsidprotein L1 wichtig. Die genaue Funktion dieser Zielregionen und ihrer Genprodukte wird in Abschnitt 1.8 beschrieben.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der HPV-Tests ist der Nachweis auf Basis von wahlweise DNA oder RNA. Die virale HPV-RNA zeigt im Vergleich einen stetigen Anstieg bei zunehmender dysplastischer Progression. RNA Sequenzen werden dabei nur in infizierten Zellen nachgewiesen und können Hinweis auf eine aktive Virusreplikation hinweisen. Dies erklärt eine höhere Spezifität dieser Tests auf Basis von HPV-RNA. (104)

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung zur Beurteilung der einzelnen HPV-Tests, sowie dem QG-MPH erfolgte in enger Abstimmung mit dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité. Das statistische Vorgehen und die einzelnen Methoden wurden in diesem Zusammenhang überprüft und als adäquat für die vorliegenden Fragestellungen eingestuft. Für die Auswertungen wurden die Programme Microsoft® Excel® 2019 Version 16.0 (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) und R® Version 4.2.1 (R Core Team) (105) genutzt.

Deskriptive Statistik

In einem ersten Schritt wurde das Studienkollektiv im Rahmen dieser Arbeit einer qualitativen statistischen Auswertung unterzogen. Hierbei werden die absoluten Häufigkeiten der Histologie-Ergebnisse aufgeschlüsselt und das Alter der Patientinnen untersucht auf Verteilung, Durschnitt und Median.

Sensitivität und Spezifität

Um eine valide Aussage über die Qualität der einzelnen Tests machen zu können wurde in einem nächsten Schritt die jeweilige Sensitivität und Spezifität für das untersuchte Patientinnenkollektiv bestimmt. Als Endpunkt der Bewertung wurde das histologische Ergebnis aus der pathologischen Untersuchung herangezogen. Entscheidend für einen effektiven Screeningtest ist dabei Detektion der histologischen Einteilung CIN2+. Zusätzlich wurden auch die Sensitivitäten und Spezifitäten für CIN3+ bestimmt.

Zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität wurde gleichzeitig das entsprechende Konfidenzintervall (95%) berechnet. Zu beachten ist, dass es sich bei den untersuchten Proben nicht um eine Screeningpopulation handelt. Es handelt sich um eine Probenauswahl von abklärungsbedürftigen Befunden. Im Diskussionsteil dieser Arbeit wird auf diesen Sachverhalt noch einmal gesondert eingegangen. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

Sensitivität = (richtig positiv getestete Patientinnen für CIN2+/CIN3+/CxCa) / (alle positiven Patientinnen CIN2+/CIN3+/CxCa nach histologischem Ergebnis)

Spezifität = (richtig negativ getestete Patientinnen für CIN2+/CIN3+) / (alle negativen Patientinnen CIN2+/CIN3+ nach histologischem Ergebnis)

Positiver und negativer Vorhersagewert

Für eine genauere Einschätzung der Aussagekraft der einzelnen HPV-Tests, sowie dem QG-MPH wurden in einem weiteren Schritt die jeweiligen PPVs (engl. positive predictive value) und NPVs (engl. negative predictive value) bestimmt. Im Unterschied zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität, geht in die Berechnung hierbei die Prävalenz für eine bestimmte Erkrankung in einer Population ein und hängt damit insbesondere von der Vortestwahrscheinlichkeit ab. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

PPV = (Sensitivität x Prävalenz für CIN2+) / ((Sensitivität x Prävalenz für CIN2+) + (1 - Spezifität) x (1 - Prävalenz für CIN2+))

NPV = (Spezifität x (1 - Prävalenz für CIN2+)) / (Spezifität x (1 - Prävalenz für CIN2+) + (1 - Sensitivität) x Prävalenz für CIN2+)

Likelihood Ratio (LR+ und LR-)

Das Likelihood Ratio (LR) gibt an, wieviel wahrscheinlicher sich ein Ergebnis unter positiven Patientinnen zeigt im Verhältnis zu negativen Patientinnen. Damit liefert das LR eine Einschätzung des jeweiligen Tests, ohne dass die Prävalenz für die Berechnung notwendig ist. Für die Berechnungen wurden folgende Formeln verwendet:

LR+ = Sensitivität für CIN2+/CIN3+ / (1 - Spezifität für CIN2+/CIN3+)

$$LR- = (1 - \text{Sensitivität für CIN2+}/\text{CIN3+}) / \text{Spezifität für CIN2+}/\text{CIN3}$$

3.6 Kostenvergleichsanalyse QG-MPH vs. Co-Testing

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine Kostenvergleichsanalyse ausgearbeitet und die entsprechenden gesundheitsökonomischen Interessensparteien analysiert. Kernthematik ist in diesem Zusammenhang ein gesundheitsökonomischer Vergleich zwischen dem Co-Testung Algorithmus und einem möglichen QG-MPH basierten Screeningalgorithmus.

Für einen entsprechenden Vergleich wurden in einem ersten Schritt die aktuellen Kosten für das Gebärmutterhalskrebscreening für das Gesundheitssystem zusammengestellt. Insbesondere die Kosten für die einzelnen diagnostischen Methoden und ärztliche Behandlungen wurden hierzu berücksichtigt.

Für die Zusammenstellung der Kosten für den QG-MPH wurden aktuelle Preise und Angebote zusammengestellt, für die theoretisch notwendigen Maßnahmen und Testkosten, um einen ersten Kostenvergleich zu generieren. Zu einigen Punkten mussten hierzu Schätzwerte herangezogen werden, da eine größere Mengenproduktion einen erheblichen Einfluss auf die Gesamtkosten hat.

In einem finalen Schritt wurden die Gesamtkosten dieser verschiedenen Screeningalgorithmen miteinander verglichen unter verschiedenen gesundheitsökonomischen Aspekten betrachtet. Dabei muss beachtet werden, dass die verschiedenen betroffenen Akteure unterschiedliche Interessen haben. Die Krankenkassen streben eine Kostenminimierung an, welche nicht im gemeinsamen Interesse der Patientinnen und Testlabor steht.

4 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich des QG-MPH mit fünf leitlinienkonformen HPV-Tests. Diese werden im Zervixkarzinomscreening zur Detektion von prä-malignen Zervixdysplasien eingesetzt. Darüber hinaus zeigt die Arbeit einen gesundheitsökonomischen Vergleich eines HPV-basierten Screeningmodells im Vergleich zu einem möglichen Screeningalgorithmus mittels QG-MPH der den Dysplasieschweregrad anzeigt. Bei dem Patientenkollektiv dieser Arbeit handelt es sich um eine elektive Subgruppe der Proben aus der FACTS-Studie (siehe Abschnitt 3.1)

Zunächst wurden die einzelnen HPV-Tests ausgewertet nach Sensitivität für CIN2+, Spezifität für CIN2+, PPV (positiv prädiktiver Wert), NPV (negativ prädiktiver Wert) als auch LR (Likelihood-ratio). Diese Auswertung erfolgte im Vergleich zu dem Goldstandard der histologischen Begutachtung (Abschnitt 4.1). Im Anschluss wurden die Ergebnisse des QG-MPH risk scores ausgewertet. Inwiefern die als uneingeschränkt korrekt angesehen histomorphologiebasierten eines jeweiligen pathologischen Ergebnisses akkurat ist, soll erst in einem späteren Abschnitt diskutiert werden.

1. HPV-Testauswertung - der einzelne HPV-Test soll hierfür nach jeweiliger Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV und LR+(-) für CIN2+ beurteilt werden (Abschnitt 4.2)
2. QG-MPH – Auswertung: die Berechnung der risk scores und die Ermittlung der HPV Positivität und des Dysplasieschweregrads
3. Vergleich der einzelnen Tests miteinander

4.1 Übereinstimmung von HPV-Test und histologischen Befunden

Das Probenkollektiv von insgesamt 162 vollständigen Patientenproben umfasst eine im Vorfeld definierte Auswahl anhand histologischer Vorbefunde, sodass ein repräsentativer Anteil verschiedener Dysplasiestadien eingeschlossen wurde (siehe 3.2). Die Vollständigkeit bezieht sich auf das Vorliegen von verwertbaren HPV-Ergebnissen aller durchgeführten Testverfahren, sowie einem histologischen Ergebnis der Probe. In dem Probenkollektiv waren 63 Proben mit Histologie CIN2+. Entsprechend lag die Zahl mit <CIN2

bei 99 Patientinnen. 9 Patientinnen hatten ein Zervixkarzinom. Die Proben mit histologischem CIN2+ Ergebnis lassen sich dabei wie folgt unterteilen.

- 21 Patientinnen mit CIN2
- 32 Patientinnen mit CIN3
- 1 Patientin mit Adenocarcinoma in situ (AIS)
- 9 Patientinnen mit Zervixkarzinom

Gesamtzahl – 63 Patientinnen CIN2+ positiv.

Die Patientinnen mit <CIN2 Histologie sind dabei wie folgt unterteilt:

- 76 Patientinnen ohne positives histologisches Ergebnis für CIN2+
- davon 4 Patientinnen: HPV negativ + Cervicitis negativ
- davon 9 Patientinnen: HPV negativ + Cervicitis positiv
- davon 28 Patientinnen: HPV positiv + Cervicitis negativ
- davon 15 Patientinnen: HPV positiv + Cervicitis positiv
- 23 Patientinnen mit CIN I

Gesamtzahl – 99 Patientinnen <CIN2

4.1.1 QG-MPH Ergebnisse der integrierten HPV-Testung

Der QG-MPH Test beinhaltet einen integrierten HPV-Test, der als Wert in den Biomarker risk scores fungiert. In der Analyse nur für die HPV Detektion zeigte dieser Testanteil folgende Ergebnisse.

Tabelle 15 - HPV-Ergebnisse des QG-MPH Assays

| Histologisches Ergebnis | QG-MPH HPV positiv | in % | QG-MPH HPV negativ | in % |
|--------------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| <CIN2 (n=99) | 41 | 41,4 | 58 | 58,6 |
| CIN2+ (n=63) | 45 | 71,4 | 18 | 28,6 |

Tabelle 15 zeigt die HPV-Assay Ergebnisse für die beiden Hauptkategorien <CIN2 / CIN2+ positiv. Hier zeigt der QG-MPH Assay folgende Ergebnisse:

Sensitivität CIN2+ -- 71,4 %
 Spezifität CIN2+ -- 58,6 %
 *PPV (positiv prädiktiver Wert) -- 1,4 %
 *NPV (negativ prädiktiver Wert) -- 99,6 %
 *LR+ (positive Likelihood-Ratio) -- 1,72
 *LR- (negative Likelihood-Ratio) -- 0,49

*Prävalenz CIN2+ - für die Berechnung dieser Statistik wurde die Prävalenz für das Auftreten einer CIN2+ in Deutschland für die Jahre 2013-2018 herangezogen. Im Jahr 2018 wurden insgesamt 623.040 Patientinnen gescreent bei einer Inzidenz von 4.180 Fällen (entspricht 0,67%). (106) Gleichzeitig lag in diesen Jahren (2013-2018) die Prävalenz zwischen 0,72 bis 0,84%. Für die Berechnungen im Rahmen dieser Arbeit wird die Prävalenz aus dem Jahr 2018 herangezogen (0,84%). (107) Es ist zu beachten, dass es sich bei der vorliegenden Patientengruppe nicht um eine Screeningpopulation handelt. Die ermittelten statistischen Ergebnisse dienen daher dem Testvergleich der einzelnen Verfahren, jedoch ist eine Aussage bezüglich der Testgüte im Rahmen eines Screeningsprogramms nicht möglich.

Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der genaueren histologischen Einteilung und die jeweiligen QG-MPH Ergebnisse.

Tabelle 16 - HPV-Ergebnisse QG-MPH für definierte Dysplasiestadien

| Histologisches Ergebnis | QuantiGene HPV positiv | in % | QuantiGene HPV negativ | in % |
|-------------------------------|------------------------|-------|------------------------|-------|
| CIN2 (n=21) | 16 | 76,2 | 5 | 23,8 |
| CIN3 (n=32) | 22 | 68,7 | 10 | 31,3 |
| Zervixkarzinom (n=6) | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Andere Karzinome (n=3) | 0 | 0,0 | 3 | 100,0 |

4.1.2 BD Onclarity HPV-Test Ergebnisse

Tabelle 17 - HPV-Ergebnisse BD Onclarity für CIN2+

| Histologisches Ergebnis | BD Onclarity HPV positiv | in % | BD Onclarity HPV negativ | in % |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|
| <CIN2 (n=99) | 46 | 46,5 | 53 | 53,5 |
| CIN2+ (n=63) | 56 | 88,9 | 7 | 11,1 |

Tabelle 17 zeigt die HPV-Assay Ergebnisse für die beiden Hauptkategorien CIN2+ positiv bzw. negativ. Hier zeigt der BD Onclarity HPV-Assay folgende Testgüte:

Sensitivität CIN2+ -- 88,9 %

Spezifität CIN2+ -- 53,5 %

*PPV (positiv prädiktiver Wert) -- 1,6 %

*NPV (negativ prädiktiver Wert) -- 99,8 %

*LR+ (positive Likelihood-Ratio) -- 1,91

*LR- (negative Likelihood-Ratio) -- 0,21

*Prävalenz CIN2+ -- 0,84 % (2018 siehe 4.1.1.)

Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der genaueren histologischen Einteilung und die jeweiligen BD Onclarity HPV Ergebnisse.

Tabelle 18 - HPV-Ergebnisse BD Onclarity CIN2+ Unterteilung

| Histologisches Ergebnis | BD Onclarity HPV positiv | in % | BD Onclarity HPV negativ | in % |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|
| CIN2 (n=21) | 19 | 90,5 | 2 | 9,5 |
| CIN3 (n=32) | 30 | 93,8 | 2 | 6,2 |
| Zervixkarzinom (n=6) | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Andere Tumore (n=3) | 0 | 0,0 | 3 | 100,0 |

4.1.3 Hologic Aptima HPV-Test Ergebnisse

Tabelle 19 - HPV-Ergebnisse Hologic Aptima HPV-Assay für CIN2+

| Histologisches Ergebnis | Aptima HPV positiv | in % | Aptima HPV negativ | in % |
|-----------------------------|--------------------|------|--------------------|------|
| CIN2+ negativ (n=99) | 51 | 51,5 | 48 | 48,5 |
| CIN2+ positiv (n=63) | 58 | 92,1 | 5 | 7,9 |

Tabelle 19 zeigt die HPV-Assay Ergebnisse für die beiden Hauptkategorien CIN2+ positiv bzw. negativ. Hier zeigt der Hologic Aptima HPV-Assay folgende Ergebnisse:

Sensitivität CIN2+ -- 92,1 %

Spezifität CIN2+ -- 48,5 %

*PPV (positiv prädiktiver Wert) -- 1,5 %

*NPV (negativ prädiktiver Wert) -- 99,9 %

*LR+ (positive Likelihood-Ratio) -- 1,79

*LR- (negative Likelihood-Ratio) -- 0,16

*Prävalenz CIN2+ -- 0,84 % (2018 siehe 4.1.1.)

Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse der genaueren histologischen Einteilung und die jeweiligen Hologic Aptima HPV Ergebnisse.

Tabelle 20 - HPV Ergebnisse Hologic Aptima HPV-Assay für Dysplasiestadien

| Histologisches Ergebnis | Aptima HPV positiv | in % | Aptima HPV negativ | in % |
|-----------------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| CIN2 (n=21) | 21 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| CIN3 (n=32) | 31 | 93,8 | 2 | 6,2 |
| Zervixkarzinom (n=6) | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Andere Tumore (n=3) | 0 | 0,0 | 3 | 100,0 |

4.1.4 Roche Cobas HPV-Test Ergebnisse

Tabelle 21 - HPV Ergebnisse Roche Cobas HPV-Assay für CIN2+

| Histologisches Ergebnis | Cobas HPV positiv | in % | Cobas HPV negativ | in % |
|--------------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| CIN2+ negativ (n=99) | 58 | 58,6 | 41 | 41,4 |
| CIN2+ positiv (n=63) | 56 | 88,9 | 7 | 11,1 |

Tabelle 21 zeigt die HPV-Assay Ergebnisse für die beiden Hauptkategorien CIN2+ positiv bzw. negativ. Hier zeigt der Roche Cobas HPV-Assay folgende Ergebnisse:

Sensitivität CIN2+ -- 88,9 %

Spezifität CIN2+ -- 41,4 %

*PPV (positiv prädiktiver Wert) -- 1,3 %

*NPV (negativ prädiktiver Wert) -- 99,8 %

*LR+ (positive Likelihood-Ratio) -- 1,52

*LR- (negative Likelihood-Ratio) -- 0,27

*Prävalenz CIN2+ -- 0,84 % (2018 siehe 4.1.1.)

Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse der genaueren histologischen Einteilung und die jeweiligen Roche Cobas HPV Ergebnisse.

Tabelle 22 - HPV Ergebnisse Roche Cobas HPV Assay für CIN2+ Unterteilung

| Histologisches Ergebnis | Cobas HPV positiv | in % | Cobas HPV negativ | in % |
|--------------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| CIN2 (n=21) | 20 | 95,2 | 1 | 4,8 |
| CIN3 (n=32) | 30 | 93,8 | 2 | 6,2 |
| Zervixkarzinom (n=6) | 5 | 83,3 | 1 | 17,7 |
| Andere Tumore (n=3) | 0 | 0,0 | 3 | 100,0 |

4.1.5 Seegene Anyplex-II HPV-Test Ergebnisse

Tabelle 23 - HPV Ergebnisse Seegene Anyplex-II HPV-Assay für CIN2+

| Histologisches Ergebnis | Seegene HPV positiv | in % | Seegene HPV negativ | in % |
|-----------------------------|---------------------|------|---------------------|------|
| CIN2+ negativ (n=99) | 79 | 79,8 | 20 | 20,2 |
| CIN2+ positiv (n=63) | 59 | 93,7 | 4 | 6,3 |

Tabelle 23 zeigt die HPV-Assay Ergebnisse für die beiden Hauptkategorien CIN2+ positiv bzw. negativ. Hier zeigt der Seegene Anyplex-II HPV-Assay folgende Ergebnisse:

Sensitivität CIN2+ -- 93,7 %

Spezifität CIN2+ -- 20,2 %

*PPV (positiv prädiktiver Wert) -- 1,0 %

*NPV (negativ prädiktiver Wert) -- 99,7 %

*LR+ (positive Likelihood-Ratio) -- 1,17

*LR- (negative Likelihood-Ratio) -- 0,31

*Prävalenz CIN2+ -- 0,84 % (2018 siehe 4.1.1.)

Tabelle 24 zeigt die Ergebnisse der genaueren histologischen Einteilung und die jeweiligen Seegene Anyplex-II HPV Ergebnisse.

Tabelle 24 - HPV Ergebnisse Seegene Anyplex-II HPV-Assay für CIN2+ Aufteilung

| Histologisches Ergebnis | Seegene HPV positiv | in % | Seegene HPV negativ | in % |
|-----------------------------|---------------------|-------|---------------------|-------|
| CIN2 (n=21) | 21 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| CIN3 (n=32) | 31 | 96,9 | 1 | 3,1 |
| Zervixkarzinom (n=6) | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Andere Tumore (n=3) | 0 | 0,0 | 3 | 100,0 |

4.1.6 MPG HPV-Test Ergebnisse

Tabelle 25 - HPV Ergebnisse MPG HPV-Assay für CIN2+

| Histologisches Ergebnis | MPG HPV positiv | in % | MPG HPV negativ | in % |
|-----------------------------|-----------------|------|-----------------|------|
| CIN2+ negativ (n=99) | 73 | 73,7 | 26 | 26,3 |
| CIN2+ positiv (n=63) | 58 | 92,1 | 5 | 7,9 |

Tabelle 25 zeigt die HPV-Assay Ergebnisse für die beiden Hauptkategorien CIN2+ positiv/negativ. Hier zeigt der MPG HPV-Assay folgende Ergebnisse:

Sensitivität CIN2+ -- 92,1 %

Spezifität CIN2+ -- 26,3 %

*PPV (positiv prädiktiver Wert) -- 1,0 %

*NPV (negativ prädiktiver Wert) -- 99,7 %

*LR+ (positive Likelihood-Ratio) -- 1,25

*LR- (negative Likelihood-Ratio) -- 0,30

*Prävalenz CIN2+ -- 0,84 % (2018 siehe 4.1.1.)

Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse der genaueren histologischen Einteilung und die jeweiligen MPG HPV Ergebnisse.

Tabelle 26 - HPV Ergebnisse MPG HPV-Assay für CIN2+ Unterteilung

| Histologisches Ergebnis | MPG HPV positiv | in % | MPG HPV negativ | in % |
|-------------------------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| CIN2 (n=21) | 21 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| CIN3 (n=32) | 31 | 96,9 | 1 | 3,1 |
| Zervixkarzinom | 5 | 83,3 | 1 | 17,7 |
| Andere Tumore | 0 | 0,0 | 3 | 100,0 |

4.1.7 HPV Gesamtergebnisse Übersicht und Ergebnisse

Im Folgenden werden die einzelnen HPV-Ergebnisse der verschiedenen Testsysteme gegenübergestellt. Die Gesamttabelle enthält alle wichtigen Vergleichsinformationen zu den einzelnen Sensitivitäten und Spezifitäten. Es zeigt sich die höchste Sensitivität bei dem HPV-Assay von Seegene mit 93,7%. Gleichzeitig ist es der HPV-Test mit der geringsten Spezifität von 20,2%.

Der QG-MPH Assay HPV zeigt bei der Bestimmung der HPV-Ergebnisse mit 71,4% zwar die geringste Sensitivität, jedoch ist er gleichzeitig mit 58,6% deutlich spezifischer als die anderen, konventionellen HPV-Tests.

Tabelle 27 - Gesamtübersicht Ergebnisse HPV-Tests

| HPV positiv / Histologie | CIN2+ positiv (sens.) | | CIN2+ negativ (spez.) | | CIN2 (sens.) | | CIN3 (sens.) | | Adeno-Ca i.s. | | SCC | | Andere Tumore | |
|---------------------------------|-----------------------------|------|-----------------------------|------|-----------------|-------|-----------------|------|------------------|-------|-----|-------|---------------|------|
| | 63 | in % | 99 | in % | 21 | in % | 32 | in % | n=1 | in % | n=6 | in % | n=3 | in % |
| Gesamtanzahl (n=162) | | | | | | | | | | | | | | |
| QuantiGene HPV | 45 | 71,4 | 58 | 58,6 | 16 | 76,2 | 22 | 68,7 | 1 | 100 | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Hologic Aptima HPV | 58 | 92,1 | 48 | 48,5 | 21 | 100,0 | 31 | 96,9 | 0 | 0,0 | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| BD Onclarity HPV | 56 | 88,9 | 53 | 53,5 | 19 | 90,5 | 30 | 93,8 | 1 | 100,0 | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Roche Cobas HPV | 56 | 88,9 | 41 | 41,4 | 20 | 95,2 | 30 | 93,8 | 1 | 100,0 | 5 | 83,3 | 0 | 0,0 |
| Seegene Anyplex HPV | 59 | 93,7 | 20 | 20,2 | 21 | 100,0 | 31 | 96,9 | 1 | 100,0 | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| MPG HPV | 58 | 92,1 | 26 | 26,3 | 21 | 100,0 | 31 | 96,9 | 1 | 100,0 | 5 | 83,3 | 0 | 0,0 |

4.2 QG-MPH Assay - risk score Auswertung

Nachdem die Auswertung der HPV-Ergebnisse bereits die Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen HPV-Tests aufzeigen konnte, wird im Folgenden der risk score des QG MPH untersucht. Für die Detektion von CIN2+ konnten die kommerziellen HPV-Tests eine hohe Sensitivität von 88,9% bis 93,7% vorweisen. Erwartungsgemäß leidet hierbei jedoch die Spezifität. Hier werden für die kommerziellen HPV-Tests Werte zwischen 20,2-53,5% erreicht. Dies ist besonders relevant, da

Ziel des QG-MPH die spezifischere Diagnostik mittels risk scores ist, welcher im Folgenden untersucht wird. Besonders in einer Screeningpopulation mit einer hohen HPV Prävalenz führen die niedrigen Spezifitäten von konventionellen HPV-Tests zu sehr großen Fallzahlen an falsch-positiven Testergebnissen. Infolge kommt es zu verunsicherten Patientinnen, die mittels Kolposkopie und Biopsie abgeklärt werden müssen und eventuell zu Übertherapie.

Der QG-MPH schließt die Quantifizierung von informativen zellulären Biomarkern über den Schweregrad der vorliegenden Dysplasie mit ein. Das Ergebnis der HPV E7 Onkoprotein und der zellulären Biomarker mRNA Expressionsstärke sind die Grundlage für das Testergebnis, das ein sogenannter risk score ist. Dieser Wert basiert auf der Einbeziehung der Biomarkerexpressionsstärke und Gewichtungskoeffizienten, welcher mittels eines vorbestimmten cutoffs entscheidet, ob ein bestimmtes Dysplasiestadium mit 80% Genauigkeit vorliegt. Dabei können gleiche Biomarker mit verschiedener Expressionsstärke und Gewichtungskoeffizienten in verschiedene Formeln eingehen mit jeweils unterschiedlichen cutoff-Werten für die drei bestimmten Dysplasiestadien CIN2+, CIN3+ und Zervixkarzinom.

Jeweils für CIN2+, CIN3+ und für CxCa werden mittels angepasster Formeln deren risk scores berechnet. Jeweils der höchste risk score, der erreicht wird, bezeichnet den Schweregrad der vorliegenden Dysplasie. Anhand dieses risk scores wird eine direkte Aussage möglich, welche zervikale Läsion vorliegt. Die Akkuratheit (Sensitivität und Spezifität) beträgt über 80%. Ein entscheidender Parameter, der in die Berechnung des risk scores einfließt ist die Stärke der E7 mRNA Expression von hr-HPV. Weitere Einflussfaktoren sind verschiedene Biomarker, die bereits in Abschnitt 1.7 detailliert beschrieben sind. Für die Auswertung des risk scores der hier untersuchten Proben, wird wieder der

Goldstandard Histologie als Endpunkt herangezogen. Tabelle 28 zeigt die verschiedenen Klassifikationen des QG-MPH risk scores für die untersuchten Proben im Verhältnis zum endgültigen histologischen Ergebnis.

Tabelle 28 – Übersicht der QG-MPH risk score Ergebnisse der untersuchten Proben für den <CIN2/CIN2+ cut off

| Histologie | QG-MPH CIN2+ | | QG-MPH CIN3 | | QG-MPH CxCa | | |
|-------------------------------|--------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------|
| | n = | risc score korrekt | in % | risc score korrekt | in % | risc score korrekt | in % |
| <CIN2 (n=99) | 99 | 69 | 69,7% | 46 | 46,5% | 80 | 80,8% |
| CIN2+ positiv (n=63) | 63 | 40 | 63,5% | 44 | 69,8% | 23 | 36,5% |
| CIN2 | 21 | 14 | 66,7% | 17 | 81,0% | 7 | 33,3% |
| CIN3 | 32 | 20 | 62,5% | 21 | 65,6% | 9 | 28,1% |
| Adenocarcinoma in situ | 1 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| Zervixkarzinom | 9 | 6 | 66,7% | 5 | 55,6% | 7 | 77,8% |

„risc score korrekt“ – beschreibt das richtig-positive bzw. richtig-negative Ergebnis des QG MPH risk scores in Abhängigkeit zum jeweiligen histologischen Ergebnis. Beispielsweise ist bei einer Histologie mit CIN3 der positive risk score für CIN2+ und für CIN3 korrekt, der CxCa risk score hingegen ist bei negativem Ergebnis korrekt.

Entscheidend für die qualitative Beurteilung des risk scores sind die einzelnen Unterteilungen der jeweiligen histologischen Ergebnisse und die Einschätzung durch das QG-MPH Ergebnis. Tabelle 29 differenziert die zu geringe Einstufung (Unterbewertung) eines Dysplasieschweregrades durch den QG-MPH, die korrekte Einstufung durch den QG-MPH und die Überbewertung durch den QG-MPH von histologischen Ergebnissen. Bei Ansicht der einzelnen Untergruppen wird eine CIN2 in 90,5% der Fälle erkannt und nur in zwei Fällen (9,5%) verpasst. Bei der Gruppe der CIN3 werden 71,9% der Fälle erkannt und neun Fälle (28,1%) verpasst bzw. als zu niedrige Läsion eingestuft. Bei den Karzinomen werden sämtliche (sechs Fälle) ohne Ausnahme richtig eingestuft. Fasst man die Gruppe der Histologien zusammen als CIN2+, so ergibt sich eine gesamte Erkennungsrate von 81,4%.

Für die Patientinnen mit geringerem histologischem Ergebnis als CIN2 liegt die korrekte Einschätzung durch den QG-MPH bei 42,1%. In 44 Fällen (58,9%) wird die zervikale Läsion überbewertet. Fasst man die Gruppen Histologie ohne Dysplasie und CIN1 zusammen kommt man auf ein Ergebnis von 40,4% (40 Fälle). In 59,6% der Fälle werden diese Histologien durch die QG-MPH risk scores überbewertet. In der Kategorie „Andere Karzinome“ wurde interessanterweise dabei ein HPV-negatives Karzinom über den QG risk-score detektiert. Dieser Tumor wurde von allen anderen verwendeten Tests nicht als ein Karzinom erkannt. In einer Screening Situation wäre dieses Karzinom nur über den QG-MPH entdeckt worden.

Tabelle 29 - QG-MPH risc score Auswertung für die verschiedenen histologischen Ergebnisse und HPV Befunde

| | QG unterbewertet | QG korrekt | QG überbewertet |
|--|------------------|------------|-----------------|
| Histologie | [n] | [n] | [n] |
| <i>Keine Dysplasie total (n=76)</i> | n.a. | 32 (42,1%) | 44 (58,9%) |
| <i>Keine Dysplasie HPV neg. (n=33)</i> | n.a. | 17 (51,5%) | 16 (48,5%) |
| <i>Keine Dysplasie HPV pos. (n=43)</i> | n.a. | 16 (37,2%) | 27 (62,8%) |
| <i>CIN 1 (n=23)</i> | n.a. | 8 (34,8%) | 15 (65,2%) |
| <i>CIN 2 (n=21)</i> | 2 (9,5%) | 1 (4,8%) | 18 (85,7%) |
| <i>CIN 3 (n=32)</i> | 9 (28,1%) | 14 (43,8%) | 9 (28,1%) |
| <i>SCC (n=6)</i> | 0 (0,0%) | 6 (100,0%) | n.a. |
| <i>Andere Karzinome (n=3)</i> | 2 (66,6%) | 1 (33,3%) | n.a. |
| <i>AdenoCA (n=1)</i> | 1 | 0 (0%) | n.a. |

*n.a. = nicht anwendbar

Für eine genauere Unterteilung der einzelnen Histologie-Ergebnisse ist Tabelle 30 maßgeblich notwendig. Hierbei handelt es sich im Folgenden über eine genaue Unterteilung der verschiedenen Ergebnisse der Pathologie. Die Kategorie „keine Dysplasie“ wurde insgesamt in vier verschiedene Unterkategorien geteilt. Hierdurch soll insbesondere untersucht werden, ob sich der risk-score in einer bestimmten Unterkategorie unterschiedlich verhält. Infektionen an der Portio, die nicht durch HPV verursacht sind, könnten in diesem Zusammenhang auch Einfluss auf das QG-MPH Ergebnis haben, weshalb diese Unterkategorien eingeführt wurden. Insbesondere gilt dies für die Kategorien „Cervicitis HPV negativ“ und „Cervicitis HPV positiv“. Die Cervicitis ist ein häufiger Befund in der

Kolposkopiesprechstunde und sowohl zytologisch als auch kolposkopisch oftmals nicht einfach von dysplastischen Veränderungen abgrenzbar, oder verschleiern das Ergebnis der kolposkopischen Untersuchung. Aus diesem Grund ist hier eine gesonderte Unterteilung erfolgt, um eventuell Unterschiede in der Diagnostik zu untersuchen. Hier zeigt sich ein deutlich größerer Anteil an negativen risk scores für HPV negative Proben (66,7%). Für die HPV positiven Patientinnen mit Cervicitis zeigt der risk score nur in 40% einen negativen Wert an. Für alle histologisch negativen Patientinnen wurde in 41,7% ein risk score <CIN2 ermittelt. Darüber hinaus wurden alle Karzinome mit entsprechendem risk score richtig als solche diagnostiziert.

Tabelle 30 - QG-MPH risk score Auswertungen nach histologischer Aufteilung – A. Skof modifiziert

| Histologie | QG Ergebnis | total | |
|--------------------------|----------------------|-----------|--------------|
| | | n | % |
| Cervicitis | <CIN2 | 6 | 40,0% |
| HPV positiv (MPG) | nur CIN2 | 1 | 6,7% |
| n=15 | nur CIN3 | 4 | 26,7% |
| | nur CxCa | 1 | 6,7% |
| | CIN 2 + CIN 3 | 3 | 20,0% |
| | CIN 2 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 3 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 2 + CIN 3 + CxCa | 1 | 6,7% |
| Cervicitis | <CIN2 | 6 | 66,7% |
| HPV negativ (MPG) | nur CIN2 | 0 | 0,0% |
| n=9 | nur CIN3 | 1 | 11,1% |
| | nur CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 2 + CIN 3 | 2 | 22,2% |
| | CIN 2 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 3 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 2 + CIN 3 + CxCa | 0 | 0,0% |
| Keine Dysplasie | <CIN2 | 10 | 35,7% |
| HPV positiv (MPG) | nur CIN2 | 0 | 0,0% |
| n=28 | nur CIN3 | 10 | 35,7% |
| | nur CxCa | 1 | 3,6% |
| | CIN 2 + CIN 3 | 3 | 10,7% |
| | CIN 2 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 3 + CxCa | 2 | 7,1% |
| | CIN 2 + CIN 3 + CxCa | 2 | 7,1% |
| Keine Dysplasie | <CIN2 | 10 | 41,7% |
| HPV negativ (MPG) | nur CIN2 | 0 | 0,0% |
| n=24 | nur CIN3 | 3 | 12,5% |
| | nur CxCa | 1 | 4,2% |
| | CIN 2 + CIN 3 | 1 | 4,2% |
| | CIN 2 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 3 + CxCa | 2 | 8,3% |
| | CIN 2 + CIN 3 + CxCa | 7 | 29,2% |

| | | | |
|-----------------------|----------------------|-----------|---------------|
| normal | <CIN2 | 32 | 42,1% |
| n=24 Cervicitis | nur CIN2 | 1 | 1,3% |
| n=52 keine Dysplasie | nur CIN3 | 18 | 23,7% |
| n=76 | nur CxCa | 2 | 2,6% |
| | CIN 2 + CIN 3 | 9 | 11,8% |
| | CIN 2 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 3 + CxCa | 4 | 5,3% |
| | CIN 2 + CIN 3 + CxCa | 10 | 13,2% |
| CIN 1 | <CIN2 | 8 | 34,8% |
| n=23 | nur CIN2 | 3 | 13,0% |
| | nur CIN3 | 3 | 13,0% |
| | nur CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 2 + CIN 3 | 6 | 26,1% |
| | CIN 2 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 3 + CxCa | 2 | 8,7% |
| | CIN 2 + CIN 3 + CxCa | 1 | 4,3% |
| CIN 2 | <CIN2 | 2 | 9,5% |
| n=21 | nur CIN 2 | 1 | 4,8% |
| | nur CIN3 | 2 | 9,5% |
| | nur CxCa | 1 | 4,8% |
| | CIN 2 + CIN 3 | 9 | 42,9% |
| | CIN 2 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 3 + CxCa | 2 | 9,5% |
| | CIN 2 + CIN 3 + CxCa | 4 | 19,0% |
| CIN 3 | <CIN2 | 9 | 28,1% |
| n=32 | nur CIN 2 | 1 | 3,1% |
| | nur CIN3 | 2 | 6,3% |
| | nur CxCa | 2 | 6,3% |
| | CIN 2 + CIN 3 | 12 | 37,5% |
| | CIN 2 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 3 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 2 + CIN 3 + CxCa | 7 | 21,9% |
| Zervixkarzinom | <CIN2 | - | 0,0% |
| n=6 | nur CIN 2 | - | 0,0% |
| | nur CIN3 | - | 0,0% |
| | nur CxCa | 2 | 33,3% |
| | CIN 2 + CIN 3 | 0 | 0,0% |
| | CIN 2 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 3 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 2 + CIN 3 + CxCa | 4 | 66,7% |
| Adenokarzinom | <CIN2 | 1 | 100,0% |
| n=1 | nur CIN 2 | 0 | 0,0% |
| | nur CIN3 | 0 | 0,0% |
| | nur CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 2 + CIN 3 | 0 | 0,0% |
| | CIN 2 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 3 + CxCa | 0 | 0,0% |
| | CIN 2 + CIN 3 + CxCa | 0 | 0,0% |

Für ein besseres Verständnis, welche Ursachen für Unter- bzw. Überbewertung durch den QG-MPH verantwortlich sein könnten, müssen einige weitere Untersuchungen angestellt werden. In einem ersten Schritt sollen hierzu die CIN3-Ergebnisse genauer betrachtet werden. Für die Überprüfung der Ergebnisse wurde als Goldstandard HPV-Test der MPG herangezogen. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie 32 Patientinnen mit einer CIN3 eingeschlossen. Diese Fälle haben bei der HPV-Untersuchung mittels MPG-Assay jeweils unterschiedliche HPV-Ergebnisse erhalten. Immerhin 10 Patientinnen mit CIN3 hatten einen negativen HPV Befund (31,3%). Die gleiche Anzahl (10 Patientinnen) hatte in diesem Zusammenhang ein HPV-Ergebnis mit Typ 16 oder Typ 18. Die Aufstellung ist in Tabelle 31 gezeigt. Die Aufteilung der verschiedenen HPV-Typen in unterschiedliche Kategorien ermöglicht eine genauere Untersuchung dieses Sachverhaltes. Die HPV-Typen wurden dabei wie folgt aufgeteilt:

HPV16/18

HHR – high-risk HPV-Typen – 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 (7 häufigste HPV-Typen assoziiert mit dem Zervixkarzinom – 90%)

IR – intermediate-risk HPV-Typen – 35, 39, 51, 56, 59

RC – rarely-carcinogenic HPV-Typen – 26, 53, 66, 68, 73, 82

Keine Onkogene Expression – QG-MPH negativ

Tabelle 31 - QG-MPH HPV-Ergebnisse für CIN3

| | Anzahl (n) | in % |
|--------------------------------------|------------|--------|
| HPV Typ | | |
| Typ 16/18 | 10 | 31,3 % |
| HHR (16,18,31,33,45,52,58) | 11 | 34,4 % |
| IR (35,39,51,56,59) | 1 | 3,1 % |
| RC (26,53,66,68,73,82) | 0 | 0,0 % |
| negativ | 10 | 31,3 % |

Die HPV-Typenverteilung und jeweilige QG-MPH Ergebnisse ist in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32 - QG risk score Einteilung Ergebnisse

| HPV Typen | QG verpasst n= 9 (28,1 %) | QG korrekt n= 14 (43,8 %) | QG überbewertet n= 9 (28,1 %) |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Typ 16/18 | 0 (0 %) | 7 (50 %) | 3 (33,3 %) |
| HHR (16,18,31,33,45,52,58) | 3 (33,3 %) | 11 (78,6 %) | 7 (77,8 %) |
| IR (35,39,51,56,59) | 1 (11,1 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| RC (26,53,66,68,73,82) | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| negativ | 5 (55,6 %) | 3 (21,4 %) | 2 (22,2 %) |

Für ein besseres Verständnis müssen jetzt die QG-MPH risk score Ergebnisse für diese CIN3 Fälle verglichen werden. Für die Fälle, bei denen der QG-MPH risk score die Läsion unterbewertet finden sich insgesamt 9 Fälle. Immerhin 55,6% dieser Fälle (5 Patientinnen) weisen einen negativen HPV MPG vor. Keiner der unterbewerteten Fälle weist dabei einen HPV Typ 16 oder Typ 18 auf. Für die Überbewertung durch den QG-MPH risk score zeigt sich ein verändertes Bild. In nur zwei Fällen der Überbewertung hatte die Patientin einen negativen HPV-Test (22,2%). In drei Fällen hatte die Patientin einen Typ 16 oder Typ 18 (33,3%) und in weiteren vier Fällen (44,4%) handelte es sich um einen HPV Typ der Kategorie HHR (=“high high risk“). Folglich waren die stärker karzinogenen Typen in der Kategorie Überbewertenden risk score Berechnung häufiger und das E7 Onkogen stärker exprimiert. Dies sind erste Hinweise, dass die Überbewertung durch die risk scores und folglich der Biomarkerexpression das biologische Potenzial und eine Prognose der Entwicklung wiedergeben könnte.

4.3 Kostenvergleichsanalyse QG-MPH vs. Co-Testing

Im Folgenden Abschnitt soll eine gesundheitsökonomische Evaluation der HPV Testung beim Gebärmutterhalskrebsscreening in Deutschland erfolgen. Hierzu werden zunächst die Screeningkosten des aktuellen Algorithmus zusammengefasst und erläutert. Dieser Zusammenstellung folgt ein hypothetisches Screeningmodell mittels des neu entwickelten QG-MPH. Der direkte Kostenvergleich soll abschließend eine Abschätzung über die verschiedenen Screeningalgorithmen unter gesundheitsökonomischen Gesichtspunkten geben. In dieser Analyse soll die Sichtweise der gesetzlichen Krankenversicherung eingenommen werden, die prinzipiell eine wirtschaftliche Optimierung bei einer tragbaren Kosten/Nutzen-Relation anstrebt.

Grundlage der Berechnungen ist der Einheitliche Bewertungsmaßstab (EBM) der Kassenärztlichen Vereinigung als Grundlage der Vertragsärztlichen Vergütung im Rahmen der gesetzlichen Gesundheitsversorgung. Eine Kostenanalyse und Vergütung gemäß Gebührenordnung für Ärzte (GOÄ) im Rahmen der privaten Krankenversicherung soll an dieser Stelle nicht erfolgen.

4.3.1 Kostenübersicht nach EBM des Co-Testings seit 2020

Zur Einführung des Co-Testing ab 1. Januar 2020 wurden auch die Abrechnungsziffern im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung angepasst. Im Folgenden werden die für den Co-Testing Algorithmus relevanten Altersgruppen aufgeführt.

Für die Altersgruppe zwischen dem 20.-34. Lebensjahr bleibt dabei der gesetzliche Anspruch auf eine jährliche zytologische Untersuchung ohne HPV-Test bestehen. Die Vergütung für diesen Altersbereich für den Teilbereich Zytologie umfassen somit eine jährliche **Vergütung von 11,73 €** (Stand 05.2022; Kosten für zytologische Untersuchung inkl. Versandpauschale). Bei negativem Befund wird dieser Algorithmus bis zum vollendeten 34 Lebensjahr beibehalten.

Für die Altersgruppe ab dem 35. Lebensjahr kommt zu der Vergütungsleistung der zytologischen Untersuchung zusätzlich ein HPV-Test. Dieser wird mit 17,24 € vergütet. Nur im Falle eines positiven HPV-Tests kommt eine Zusatzziffer zur Anwendung, die eine

Genotypisierung für mindestens HPV 16 und 18 vergütet, was die Vergütung um weitere 17,24 € erhöht. Damit ergibt sich für diesen Altersbereich eine Gesamtvergütung von **28,97 € (negativer HPV-Test)** bzw. **46,21 € (positiver HPV-Test)**. Nach Algorithmus erfolgen diese Untersuchungen bei negativen Untersuchungsergebnissen (Zytologie- und HPV-Ergebnis) nur alle drei Jahre. In den Jahren zwei und drei erfolgt weder zytologische Untersuchung noch HPV-Test. Wichtig zu beachten ist die unterschiedliche Vorsorgeziffer des behandelnden Gynäkologen bzw. Gynäkologin. Alle drei Jahre kann in der Praxis zeitgleich zu HPV-Test und zytologischen Abstrich die 01761 (Vergütung 24,22€) verwendet werden. In den beiden Zwischenjahren kann lediglich die Ziffer 01760 herangezogen werden (Vergütung 17,91€). Da jedoch in diesem Kostenvergleich auch ein dreijähriges Intervall für die Durchführung des QG-MPH angenommen wird, ist dieser Vergütungsunterschied nicht relevant.

Tabelle 33 - Relevante Abrechnungsziffern des EBM für das Gebärmutterhalskrebscreening

| Primäres Zervixkarzinomscreening - Stand 05.2022 | | | |
|---|--|--------------------------------|---------------------------------|
| EBM - Ziffer | EBM Zifertext | 20. - 34. LJ - jährlich | ab 35. LJ - alle 3 Jahre |
| 01760 | Klinische Untersuchung ohne Abstrichentnahme | 17,91 € | 17,91 € |
| 01761 | Klinische Untersuchung einschließlich Abstrichentnahme | 24,22 € | 24,22 € |
| 01762 | Zytologische Untersuchung | 9,13 € | 9,13 € |
| 40100 | Versandkostenpauschale | 2,60 € | 2,60 € |
| 01763 | HPV-Test | - | 17,24 € |
| 01769 | HPV-Genotypisierung für Typ 16 und 18 bei positivem HPV-Ergebnis | - | 17,24 €* |
| | Insgesamt | 35,95 € | 54,57 €* |

EBM = Einheitlicher Bewertungsmaßstab, HPV = Humanes Papillomvirus, LJ = Lebensjahr

*Für die Berechnung der Vergütung für den HPV-Test ist zunächst die zugrundeliegende Prävalenz von HPV in der Bevölkerung nötig. Hierzu gibt es zahlreiche Studien aus Deutschland mit unterschiedlichen Prävalenzen. Wichtig ist dabei die Unterscheidung zwischen der Prävalenz von HPV zwischen dem 18.-34. Lebensjahr und ab dem 35.

Lebensjahr. Zahlreiche Studien zeigen, dass die Prävalenz in der Altersgruppe zwischen 18.-34. Jahre deutlich erhöht ist (MARZY unter 30 Jahre 22,3%) (108). Für Patientinnen über dem 35. Lebensjahr zeigen Studien für Deutschland eine Prävalenz für HPV-Infektionen zwischen 6-13% - je nach Region. (109) (110). Für die vorliegende Arbeit werden wir eine vereinfachte Annahme von 8% HPV-Positivität in der deutschen Bevölkerung für Patientinnen über 35 Jahre annehmen. Somit ergibt sich ein durchschnittlicher HPV-Vergütungssatz pro gescreener Frau für ein Dreijahresintervall von $17,24\text{€} + (17,24\text{€} \times 0,08) = 18,62\text{€}$.

Tabelle 34 - Relevante Abrechnungsziffern des EBM für die Abklärungsdiagnostik im Rahmen des Gebärmutterhalskrebscreenings

| Abklärungsdiagnostik Zervixkarzinomscreening - Stand 05.2022 | | | |
|---|--|---------------------|------------------|
| EBM - Ziffer | EBM Ziffertext | 20. - 34. LJ | ab 35. LJ |
| 01764 | Abklärungsdiagnostik mit Abstrichentnahme | 10,48 € | 10,48 € |
| 01765 | Abklärungskolposkopie | 82,02 € | 82,02 € |
| 01766 | Zytologische Untersuchung bei vorliegendem Vorbefund | 32,45 €* | 32,45 €** |
| 01767 | HPV-Test | 17,24 €* | (17,24 €)** |
| 01769 | HPV-Genotypisierung bei positivem Ergebnis auf HPV-Typen 16 und 18 | 17,24 €* | (17,24 €)** |
| 40100 | Versandkostenpauschale | 2,60 € | 2,60 € |
| 01768 | Histologische Untersuchung bei der Abklärungskolposkopie | 27,59 € | 27,59 € |
| | Insgesamt | 176,17 € | 155,14 € |

*im Rahmen der Abklärungsdiagnostik für Patientinnen zwischen dem 20.-34. Lebensjahr ist eine zytologische Abklärungsuntersuchung zusätzlich zu einem HPV-Test abrechenbar. Der HPV-Test für die Patientinnen zwischen 20-34 Jahre hängt in seiner

Vergütung wieder von der Prävalenz einer HPV-Infektion in dieser Altersgruppe ab. Wir gehen im Rahmen dieser Arbeit von einer Prävalenz von durchschnittlich 22% aus – analog zur MARZY-Studie (108). Entsprechend ist die Gesamtvergütung für einen HPV-Test in dieser Altersgruppe $17,24\text{€} + (17,24\text{€} \times 0,22) = 21,03\text{€}$

**im Rahmen der Abklärungsdiagnostik für Patientinnen ab dem 35. Lebensjahr ist wahlweise entweder eine zytologische Abklärungsuntersuchung oder ein HPV-Test abrechenbar. Da in den meisten Fällen eine zytologische Kontrolle gemacht wird, nehmen wir diesen Umstand als Standardfall für die Kostenaufstellung an.

Für die Anwendung der verschiedenen Untersuchungen und vor allem die Indikation für eine kolposkopische Untersuchung ist zunächst eine Übersicht vorteilhaft von den verschiedenen Gründen für eine Kolposkopie (siehe Abbildung 14 und 15). Auch diese Indikationen sind wieder zu unterscheiden in die beiden Altersgruppen (20-34 Jahre und ab 35 Jahre).

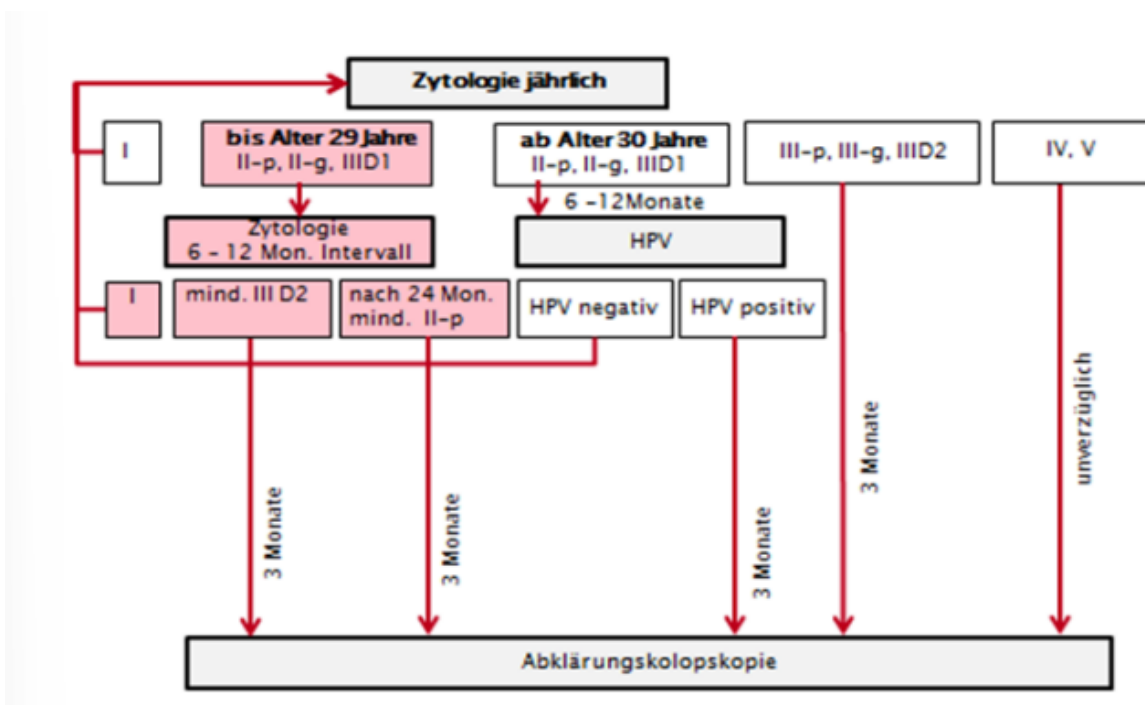


Abbildung 14 - Abklärungsalgorithmus für das Zytologie-Screening für Frauen im Alter von 20-34 Jahren – Gemeinsamer Bundesausschuss - Seite 7 (50)

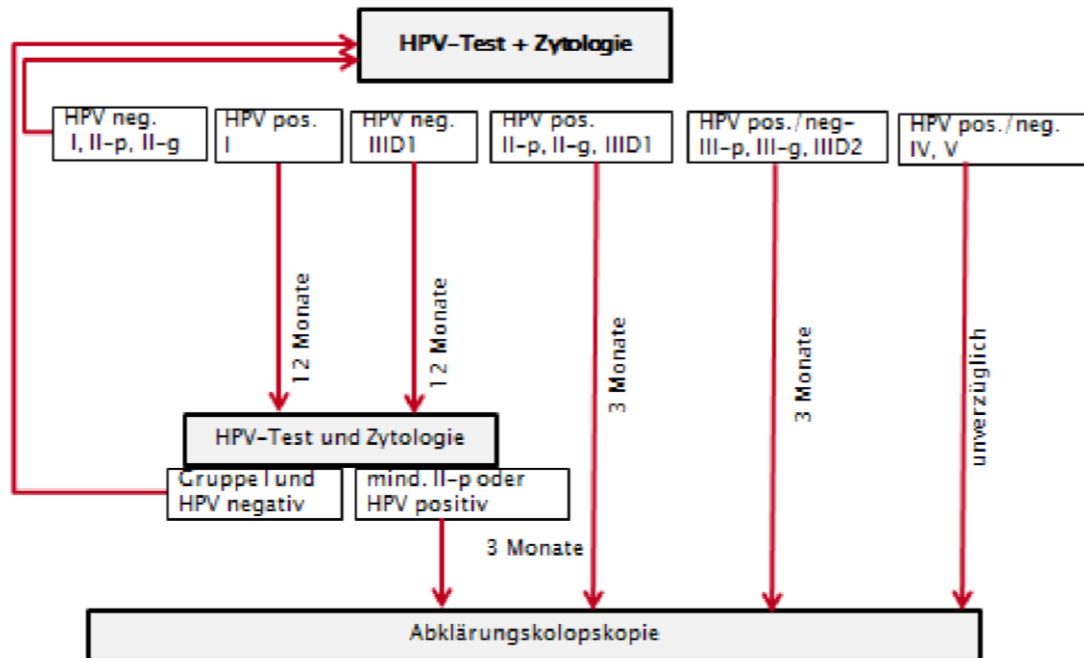


Abbildung 15 – Abklärungsalgorithmus für das kombinierte Screening für Frauen über 35 Jahren – Quelle Gemeinsamer Bundesausschuss 2020 – Seite 9 (50)

Die beiden Schaubilder zeigen jeweils das Vorgehen in der Abklärung bei entsprechenden Vorbefunden für Zytologie und HPV-Diagnostik. Es zeigt sich hier, dass eine Indikation für die Abklärungsdiagnostik in Form einer kolposkopischen Untersuchung in der Gruppe zwischen 20-34 Jahren durch einen auffälligen zytologischen Befund indiziert ist.

20. – 34 Lebensjahr – Indikationen für weitere Abklärungsuntersuchungen

- Zytologische Befunde Pap. III-p, III-g, IIID2, IV, V – Indikation für Kolposkopie
- Zytologische Befunde Pap II-p, II-g, IIID1 – Indikation für HPV-Test
- alle weiteren Zytologischen Befunde – keine Indikation für weitere Untersuchungen

Ab dem 35. Lebensjahr – Indikationen für weitere Abklärungsuntersuchungen

- Zytologische Befunde Pap. III-p, III-g, IIID2, IV, V (jeweils unabhängig vom HPV-Status) – Indikation für Kolposkopie
- Zytologische Befunde Pap II-p, II-g, IIID1 (nur bei positiven HPV-Status!) – Indikation für Kolposkopie

- HPV-positiv Status und Zytologischer Befund IIID1 bei negativen HPV-Status – Indikation zur Kontrolle nach 12 Monaten.

Entscheidend für die Gesamtkostenkalkulation ist nun die Anzahl an Patientinnen, die eine weitere Diagnostik benötigen nach dem Co-Testing Algorithmus. Um diese Zahlen genauer zu untersuchen, ist ein Blick in die Zytologische Jahresstatistik notwendig. Durch das föderal strukturierte Gesundheitswesen in Deutschland werden jährlich von jedem Bundesland separat die Zytologischen Jahresstatistiken veröffentlicht. Wir greifen für die Analyse auf die Jahresstatistik eines großen Zytologielabors in Baden-Württemberg zurück, dessen Statistik uns freundlicherweise im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurde.

Bei einem Patientinnenkollektiv gesetzlich Versicherter von 122.327 im Jahr 2021 wurden dabei folgende Zytologischen Diagnosen gestellt, die eine direkte Indikation für eine kolposkopische Untersuchung darstellen.

- 14 Fälle Gruppe Pap. V
- 236 Fälle Gruppe Pap IV
- 264 Fälle Gruppe Pap. IIID2
- 230 Fälle Gruppe Pap. III-p
- 24 Fälle Gruppe Pap. III-g
- Indikation zur Kolposkopie durch Zytologie gesamt: 768 Patientinnen (0,63%)

Hinzu kommen Patientinnen, die nur bei Vorliegen eines positiven HPV-Status eine Abklärungskolposkopie erhalten

- 840 Fälle Gruppe Pap. IIID1
- 271 Fälle Gruppe Pap. II-p
- 21 Fälle Gruppe Pap. II-g
- Indikation zur Kolposkopie durch Zytologie bei positiven HPV-Status – 1.132 Patientinnen

Darüber hinaus kommen die Patientinnen hinzu mit zweimal positiven HPV-Status innerhalb von 12 Monaten ab dem 35. Lebensjahr, was auch eine direkte Indikation für die

Überweisung in die Kolposkopiesprechstunde darstellt. Für das vorliegende Kollektiv lag die Anzahl im Jahr 2021 bei insgesamt ca. 3.800 Fällen.

Gesamt ergeben sich hiermit aus den Befunden für das Jahr 2021 1.334 Indikationen zur Durchführung einer Kolposkopie. Bei der Anzahl an insgesamt gescreenten Patientinnen ist das eine Rate von 1,1%. Hinzu kommen die Patientinnen mit zweimal HPV-positiv-Status (ca. 3800 Fälle) – es ergeben sich ca. 5.100 Fälle an Gesamtindikationen für eine kolposkopische Untersuchung, alleine in diesem einen Zytologischen Diagnostiklabor.

Gemäß aktueller Zahlen der AG-CPC zur Auswertung der ersten zwei Co-Testing Screeningrunden zeigt sich hier bundesweit eine HPV Positivrate von 8%, wobei davon 7,7% keine zytologischen Auffälligkeiten haben und daher nach einem Jahr wiederholt getestet werden. Nach 12 Monaten zeigt sich bei noch 60% dieser Frauen weiterhin ein positives HPV Ergebnis. Folglich liegt die Rate dieser Patientinnen mit zweifach positivem HPV Test und Persistenz von mindestens 12 Monaten bei 4,8%, was ca. 38.400 Frauen entspricht aus der Gruppe mit HPV Positivität und zytologischer Unauffälligkeit von ca. 800.000 Frauen.

Die kolposkopische Untersuchung wird gefolgt von zwei möglichen Szenarien. Es folgt, abhängig von dem kolposkopischen Untersuchungsergebnis, eine Therapie der Läsion mittels Konisation oder Lasertherapie oder eine Rückkehr in den normalen Screeningalgorithmus nachdem eine höhergradige Läsion histologisch ausgeschlossen werden konnte. Es sei an dieser Stelle der Vollständigkeit halber erwähnt, dass eine ambulant durchgeführte Konisation einen weiteren Vergütungsaufwand von insgesamt 253,10 € umfasst (EBM 31301, 31502, 31821). (111)

Gesamtkosten – Modellrechnung Übersicht

Die Modellkalkulation zeigt uns ein Gesamtergebnis folgender Kostenblöcke pro Patientin im Rahmen des Co-Testings.

Primärscreening Patientinnen zwischen 20-34 Jahre

35,95 € jährlich pro Patientin*

176,17 € pro Patientin x 0,02 = 3,52 €

39,47 €

Primärdiagnostik

Abklärungsdiagnostik

Gesamtkosten

Primärscreening Patientinnen aller Altersgruppen

54,57 € pro Patientin* gegeben eine HPV-Positivität von 8%
+ 155,14 € pro Patientin x 0,04 = 6,21 €

60,78 €

Primärdiagnostik

Abklärungsdiagnostik

Gesamtkosten

*) sofern wir von einer indizierten Abklärungsrate von 2% in der Altersgruppe zwischen 20-34 Jahren und 4% für die Altersgruppe ab dem 35. Lebensjahr ausgehen, kommen wir auf die aufgeführten Gesamtkosten pro Patientin pro Jahr in der entsprechenden Altersgruppe.

4.3.2 Kostenaufstellung QG-MPH

Für einen direkten Kostenvergleich mit dem derzeitigen oben dargestellten Vergütungsszenario sind die Gesamtkosten für die Durchführung des neu entwickelten QG-MPH Tests nötig. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es in der Bewertung dieser Kosten noch sehr viele ungewisse Variablen, weshalb eine Kalkulation auf Schätzwerten besteht. Diese können je nach Ausmaß und Umfang der Testung noch erheblich variieren. Aus diesem Grund sollen die einzelnen Kostenstellen im Folgenden detailliert aufgeschlüsselt und einige Informationen hierzu bereitgestellt werden.

Grundsätzlich setzen sich die Gesamtkosten für die Durchführung eines QG-MPH aus drei Hauptkostenstellen zusammen auf die speziell eingegangen werden soll. Die Kosten werden hierbei zunächst für einen vollen Lauf bestimmt und dann auf eine einzelne Probe heruntergerechnet. Stand aller Preise für Verbrauchsmaterial und Geräte beziehen sich auf Angebote aus 09/2022. Durch eine vergrößerte Abnahmemenge sind bei diesen Preisen teilweise noch erhebliche Kostenreduktionen zu erwarten.

A) Einmalmaterialien

Diese Kostenstelle umfasst sämtliche Materialien, die für die erfolgreiche Durchführung von einem Test notwendig sind. Die verwendete Herstellerfirma findet sich auch in Abschnitt 3.4.1.2.

Tabelle 35 - Aufstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien für den QG-MPH

| <i>Verbrauchsmaterial</i> | <i>Produktbezeichnung</i> | <i>Preis/Probe</i> |
|--|---|---------------------------|
| <i>Pipettenspitzen</i> | Biosphere® Filter Tips 0,5-20 µl, 2-100 µl, 100-1000 µl | ca. 0,2 € |
| <i>96-Well-Platten</i> | Microplate, 96 Well, PS, Chimney Well, µClear®, schwarz | ca. 0,1 € |
| | Hybridisationsplatte QuantiGene® 2.0 Plex Assay Kit | im QG-Kit enthalten |
| <i>Versiegelungsfolien für 96-Well-Platten</i> | Rotilabo® - Abdeckfolien für PCR - Platten | ca. 0,5 € |
| | Pressure Seals QuantiGene® 2.0 Plex Assay Kit | im QG-Kit enthalten |
| <i>Tubes</i> | Falcon® steril 50 ml | ca. 0,45 € |
| | Falcon® steril 15 ml | ca. 0,35 € |
| | 2 ml Safe Lock Tubes | ca. 0,1 € |

Tabelle 36 - Auflistung der Reagenzien des QG-MPH Assay

| <i>Reagenzien</i> | <i>Preis pro Probe</i> |
|--|-------------------------------|
| <i>Gesamtpreis pro Probe QG-MPH</i> | 20 Euro |
| <i>Lysis Mixture</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Blocking Reagent</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Proteinase K</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Probe Set</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Capture Beads</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Amplifier Diluent</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Labelprobe Diluent</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>SAPD Diluent</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Wash Buffer n° 1</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Wash Buffer n° 2</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Pre-Amplifier</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Amplifier</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Label Probe</i> | Bestandteil des QG-Kit |
| <i>Streptavidin-conjugated R-Phycoerythrin</i> | Bestandteil des QG-Kit |

Tabelle 37 -Auflistung der Reagenzien für das Luminex Durchflusszytometer

| Reagenzien | Preis pro Probe |
|----------------------------|------------------------|
| <i>RNase-freies Wasser</i> | ca. 0,5 € |
| <i>Sheath-Fluid</i> | ca. 0,02 € |
| <i>Hypochlorid / NaOH</i> | ca. 0,02 € |
| <i>Isopropanol</i> | ca. 0,02 € |

B) Geräte und Laborequipment

Für die Durchführung des QG-MPH sind besondere Geräte nötig.

Tabelle 38 - Aufstellung der verwendeten Geräte

| Gerätetyp | Name | Anschaffungspreis |
|---------------------------------------|--|--------------------------|
| <i>Vortexmischer</i> | Vortex Genie 2 | 500 € |
| <i>Wasserbad</i> | TW 8 | 535 € |
| <i>Thermometer</i> | QuantiGene Incubator | 100 € |
| <i>Handheld Magnetic Plate Washer</i> | Bio – Plex | 1.000 € |
| <i>Zentrifugen</i> | Heraeus Multifuge | 3.500 € |
| <i>Mini-Zentifuge</i> | MiniSpin | 1.000 € |
| <i>2 Platten-Zentrifuge</i> | PlateFuge | 500 € |
| <i>Thermoschüttler (2 ml)</i> | Thermomix comfort | 1.700 € |
| <i>Luminex® Reader</i> | MagPix® | 36.000 € |
| <i>Kühl- und Gefrierschränke</i> | 4°C | 2.000 € |
| | -20°C | 2.000 € |
| | -80°C | 12.000 € |
| <i>Werkbank</i> | HeraSafe KS 12 | 5.800 € |
| <i>Pipetten</i> | Research plus - 0,5 -10 µl; 10µl; 10-100 µl; 100-1000 µl | 300 € |
| | Research plus – 8 Kanal; 0,5 – 10 µl; 30 – 300 µl | 800 € |

C) Arbeitszeit und Optimierungsoptionen

Für die Durchführung eines vollen QG-MPH Laufs von 92 Proben ist eine hands-on time von 8 Stunden nötig.

Sowohl für die Materialien als auch die hands-on time gibt es enormes Optimierungspotenzial, welches natürlich erst bei einer deutlichen Erhöhung von Patientenproben auswirken würde. Auch ist bei einer größeren Abnahmemenge ein vollautomatisierter Pipettierroboter realisierbar. Dieser wird die hands-on time auf ein Minimum reduzieren und so weitere Kosten reduzieren.

Gesamtkosten QG-MPH und zukünftige Entwicklung

Die Gesamtkosten für eine einzelne QG-MPH Probe liegen aktuell bei einem Preis von 22 € für Material und Gerätekosten (Stand 09/2022). Hinzu kommen Laborflächen und Kosten für Personal und Arbeitseinsatz.

Damit ergibt sich ein aktueller Testpreis von 22 € pro Probe. Dieser Testpreis basiert aktuell auf einer geringen Abnahmemenge. Es ist davon auszugehen, dass durch erhöhte Abnahmemengen ein deutlicher reduzierter Testpreis erreicht werden kann. Genaue Zahlen liegen zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht vor.

4.3.3 Vergleich QG-MPH Screening vs. HPV-Zytologie Co-Testing

In erster Linie ist für eine erfolgreiche Einführung des QG-MPH eine gute Testperformance und deutlicher Mehrwert von entscheidender Bedeutung. Gerade für einen Screeningtest sind die Parameter Sensitivität und Spezifität entscheidend. Hierzu findet sich im Kapitel 4.2. alle relevanten Informationen. Zusammenfassend bietet der QG-MPH eine gute Spezifität bei nur geringgradig niedrigerer Sensitivität für die Detektion von CIN2+. Die statistischen Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit, sowie auch die berechnete Testgüte, sind aufgrund der begrenzten Probenanzahl dieser Berechnungen nur eingeschränkt aussagekräftig. Für Berechnungen mit höherem Evidenzgrad sind weitere Studien und Untersuchungen in der Screening und Triage Situation nötig.

Darüber hinaus ist der Testpreis ein weiterer wichtiger Parameter für eine erfolgreiche Einführung im Rahmen eines Vorsorgescreenings. Im Folgenden soll nochmal die Vergütung gezeigt werden für das aktuelle Gebärmutterhalskrebscreening.

Vergütung der Testung einer Screeningteilnehmerin von 20-34 Jahren

39,47 € Gesamtkosten pro Jahr pro Patientin – Zytologie Primärscreening

Vergütung der Testung einer Screeningteilnehmerin ab 35 Jahren

60,78 € Gesamtkosten pro Jahr pro Patientin – Co-Testing HPV+Zytologie

Neben der Kostendimension gibt es weitere relevante Dimensionen, die für die Einführung eines Früherkennungsscreenings relevant sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollen einige weitere Dimensionen genannt werden.

Faktor „Zeit“ für die Patientin

Diese Dimension ist vor allem aus Sicht der Patientin wichtig. Im Rahmen eines Screeningmodells mittels HPV- und/oder Zytologie ist für die Abklärung eine kolposkopische Untersuchung mit anschließender Histologie notwendig. Die notwendige Zeit, die die Patientin für eine solche Abklärungsdiagnostik auf sich nehmen muss ist sehr unterschiedlich und hängt natürlich nicht zuletzt von den lokalen Gegebenheiten und Verfügbarkeit ab. In jedem Fall ist ein erneuter Besuch in einer spezialisierten Dysplasiesprechstunde notwendig. Im Vergleich hierzu bietet der QG-MPH die direkte Einordnung der Läsion, ohne dass eine weitere Diagnostik notwendig ist. Der Aspekt Zeit spricht damit eindeutig für die Einführung des QG-MPH. Auch die reine Ergebnisdauer liegt bei einer Untersuchung mittels QG-MPH bei ca. 48 Stunden. Im Vergleich kann die Testung mittels Zytologie, HPV und Kolposkopie bis zu 12 Wochen inklusive histologischen Ergebnis dauern.

Faktor „Stress“ für die Patientin

Der Grad an Verunsicherung einer Patientin im Rahmen eines positiven Befundes einer HPV-Infektion ist sehr groß. Viele Patientinnen sind mit einer solchen Diagnose stark verunsichert. Besonders gilt auch für Patientinnen mit negativer Histologie im Rahmen der Abklärungskolposkopie. Sie sind weiterhin HPV positiv und können hiergegen auch zunächst nichts unternehmen. Dies löst in vielen Patientinnen ein großes Mass an Verunsicherung und Stress aus. Es sind zu diesem Faktor dringend weitere Untersuchungen und verlässliche Daten notwendig für die genaue Einschätzung und Evaluierung dieser Dimension. In jedem Fall bietet auch hier der QG-MPH den ganz entscheidenden Vorteil, dass eine direkte Einschätzung in „behandlungsbedürftiger Befund“ und „nicht behandlungsbedürftiger Befund“ erfolgt und damit keine zusätzliche Verunsicherung der

Patientin erfolgt, sowie eine eindeutige Indikation zur weiteren Untersuchung mittels Kolposkopie oder den Verzicht auf eine solche Untersuchung möglich ist.

Faktor „begrenzte Ressourcen“

Diese Dimension ist von besonderer Bedeutung in ressourcenschwachen Regionen mit hoher HPV-Prävalenz. Insbesondere LMIC werden von der Einführung des QG-MPH profitieren. Hier ist ein HPV-Primärscreening nicht sinnvoll, da alle HPV-positiven Patientinnen auch entsprechend abgeklärt werden müssten. Hierfür wiederum wäre eine hohe Kapazität an Ärzten und Zentren für Kolposkopie notwendig. Da dieser Umstand in diesen Ländern nicht umsetzbar ist, wäre die Einführung eines QG-MPH Screenings von entscheidendem Vorteil und könnte so die Gesundheitsversorgung in Bezug auf Zervixdysplasien verbessern.

Faktor „Probenabarbeitung“

Die meisten kommerziell dominierenden HPV-Tests bieten inzwischen vollautomatisierte Geräte zur Abarbeitung der Proben. Diese Geräte haben jedoch einen erheblichen Wartungsaufwand und sind mit großen initialen Investitionskosten verbunden. Insbesondere in LMIC stellt dieser Umstand eine große Barriere dar. Das Gerätesystem des QG-MPH bietet hier eine sehr kostengünstige Alternative mit geringen Investitionskosten von ca. 100.000 Euro. Diese gehen allerdings zulasten eines geringeren Probendurchsatzes einher. Je nach Region und Probenmenge wäre es vorteilhaft, eine automatisierte Lösung zu realisieren.

5 Diskussion

Die vorliegende Dissertationsarbeit fällt in eine Zeit der internationalen Diskussion zum Thema Gebärmutterhalskrebscreening. Nach 50 Jahren erfolgreichem Gebärmutterhalskrebscreening durch jährliche zytologische Kontrollen aller Altersklassen, wurde das Screening in Deutschland im Jahr 2020 mit einem HPV-Test für Patientinnen ab dem 35. Lebensjahr ergänzt. Man möchte hiermit die in der Literatur beschriebene, nicht ausreichende Sensitivität der zytologischen Untersuchung ergänzen und verbessern. Der HPV-Test selbst hingegen bietet ein umgekehrtes Bild. Eine alleinige HPV-Testung zeigt eine vergleichsweise höhere Sensitivität, jedoch zulasten einer geringeren Spezifität für die

Detektion von CIN2+ weil der Virusnachweis selbst auch Infektion ohne Krankheitswert detektiert. (112)

Die Kombination der beiden Testverfahren verursacht eine große Anzahl an Patientinnen, die mittels kolposkopischer Untersuchung abgeklärt und gegebenenfalls auch biopsiert werden müssen. Viele dieser Patientinnen haben trotz Indikation zur Kolposkopie durch einen positiven HPV-Test oder eine auffällige Zytologie tatsächlich keinen diagnostizierten behandlungsbedürftigen Dysplasiebefund. (113) (114) Diese Form der Triage ist, neben der Verängstigung der Patientin, durch den erneuten Besuch in einem spezialisierten Kolposkopiezentrum aufwändig und kostenintensiv für das Gesundheitssystem.

Der QG-MPH Assay, ein an der Charité neu entwickelter Test, soll eine neue Möglichkeit zur Triage bieten. Der Test kann direkt Aufschluss über den Schweregrad einer Läsion geben mithilfe der Detektion und Evaluation verschiedener viraler und zellulärer Biomarker (Abschnitt 1.8). Damit wird eine verbesserte Spezifität erreicht und es kann etwaige Überdiagnostik und Therapie verhindert werden.

Mithilfe der Bestimmung von Biomarkerexpression findet eine Abbildung der Zellphysiologie der Zellen im Screeningabstrich statt. Dabei können Expressionsänderungen im dysplastischen Zellanteil qualitativ und quantitativ erkannt werden und auf das Vorhandensein und den Grad einer Dysplasie zurückgeschlossen werden. (103)

Hierdurch wird es möglich nicht nur ein Risiko für das Vorliegen einer Dysplasie bei HPV-Positivität zu erkennen, sondern Informationen über das tatsächliche Vorhandensein und den Schweregrad zu erhalten sowie potentiell auch eine prognostische Aussage zur Progression oder Regression kann möglich sein. Der behandelnde Arzt erhält hierdurch eine genaue Diagnose über den Dysplasiegrad der Läsion und kann dadurch eine sehr gezielte Therapie einleiten. Darüber hinaus könnte der Patientin durch den Einsatz von QG-MPH eine weitere Untersuchung in Form einer Kolposkopie erspart bleiben. Die Patientin würde hierdurch nicht verängstigt und hätte einen zusätzlichen Gewinn an Lebensqualität.

Potenziell ergeben sich im Zusammenhang mit der Verwendung des QG-MPH weitere Vorteile. Es kann durch den Einsatz zu einer Reduktion der Übertherapie kommen. Bei Therapie durch Konisation im gebärfähigen Alter kommt es zu Gewebeverlust und

damit kann die Haltungrfunktion der Zervix bei nachfolgenden Schwangerschaften beeinträchtigt werden. Das kann zu einem höheren Risiko für Frühgeburlichkeit und veringertem Geburtsgewicht bei nachfolgender Schwangerschaft führen. (115) (116)

Besonders Gesundheitssysteme in LMIC könnten profitieren durch ein effizientes, fokussiertes Screening mit gezielter Abklärungsdiagnostik von Patientinnen mit Dysplasie. Vor allem die höhere Spezifität könnte HPV positive Frauen ohne Dysplasie ausschließen und überflüssige Abklärungsuntersuchungen mittels Kolposkopie ersparen. Das Testverfahren integriert damit alle diagnostischen Folgeschritte in einem Assay wie die erneute HPV-Testung, die zytologische Kontrolle, Biomarkerbestimmung oder kolposkopische Untersuchung sowie der damit verbundenen Biopsieentnahme und histologischen Begutachtung.

Im Vergleich zu einer konventionellen Testung mittels HPV und Zytologie kann es jedoch zu mehr falsch-negativen Testergebnissen kommen. Die Sensitivität für CIN2+ ist niedriger als bei einer Testung von HPV. Bei den falsch-negativen Testergebnissen könnte es sich allerdings um Dysplasiebefunde handeln, die regredient sind. Eine Vielzahl der Dysplasiebefunde an der Zervix regredieren auch ohne eine Therapie. (117) Bislang ist es nicht möglich vorherzusagen, bei welcher Patientin die HPV Infektion und Dysplasie spontan regredient und bei wem es zu einer Progression kommt. Der QG-MPH könnte die regredienten Dysplasien als solche erkennen und direkt als nicht behandlungsbedürftig einstufen. Bei diesen regredienten Dysplasien könnte die Biomarkerexpression der einzelnen risk-scores erniedrigt sein und somit werden negative Testergebnisse ausgewiesen.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel den QG-MPH mit der Akkuratheit von Leitlinienkonformen HPV-Tests zu vergleichen. (118) Dazu wurden die Sensitivitäten, Spezifitäten, sowie positive und negative Vorhersagewerte herangezogen. Es soll gezeigt werden, dass der QG-MPH eine hohe Testgenauigkeit hat und mit verbesserter Spezifität zur Vermeidung von Überdiagnostik und Übertherapie beiträgt. Hierzu wurden als Teil der FACTS-Studie zervikale Abstriche von 162 Patientinnen ausgewählt, die alle Dysplasiestadien repräsentierten, mittels QG-MPH und mit fünf etablierten und leitlinienkonformen HPV-Tests gemessen und die Ergebnisse verglichen. Darüber hinaus sollte eine gesundheitsökonomische Betrachtung des innovativen Testverfahrens in Beziehung zu der aktuellen Vergütung der Ko-Testung in Deutschland erfolgen.

5.1 Testauswertung HPV Ergebnisse

Die Auswertung der einzelnen, Screening-konformen HPV-Tests zeigen erwartungsgemäß in dem vorliegenden Probenstet eine hohe Sensitivität für CIN2+ (88,9 - 93,7%). Die höchste Sensitivität für die Detektion von CIN2+ erreicht der Seegene HPV-Assay mit 93,7%. Die niedrigste Sensitivität von 88,9% zeigte sich sowohl beim Roche Cobas HPV-Assay als auch beim BD Onclarity HPV Test.

Die Spezifität der HPV-Tests ist gering (20,2 – 53,5%). Die geringste Spezifität hat der Seegene HPV-Assay mit 20,2%. Die höchste Spezifität zeigt sich beim BD Onclarity HPV Assay mit 53,5%. Das Problem im Screening mit geringer Spezifität für den Nachweis von CIN2+ sind die zahlreichen falsch-positiven Patientinnen, die eine überflüssige Abklärungsdiagnostik und Biopsieentnahme im Rahmen einer Kolposkopie erhalten.

Der interne HPV-Assayanteil des QG-MPH zeigt im Verhältnis zu den PCR-basierten beziehungsweise target-amplifizierenden Tests eine geringere Sensitivität (71,4%). Insbesondere weil der QG-MPH keine Amplifikation des Targets vornimmt, sondern nur das Signal verstärkt wird. Hierdurch lässt sich die geringere Sensitivität erklären.

Allerdings zeigt sich eine höhere Spezifität von 58,6% im Vergleich zur durchschnittlichen Spezifität der leitlinienkonformen Tests. Für die Akkuratheit des QG-MPH ist dieses Ergebnis durchaus zu erwarten gewesen. Für den Einsatz als Triage Methode ist diese höhere Spezifität von sehr zentraler Bedeutung, da hierdurch überflüssige Kolposkopien verhindert werden können. Dieser Umstand spielt insbesondere in LMIC eine entscheidende Rolle für die Einführung einer Screeningmethode mit hoher Effektivität.

Beim Einsatz im Primärscreening spielt dagegen die Sensitivität eine übergeordnete Rolle. Hier sollen möglichst wenige bzw. keine Patientinnen mit Dysplasie unerkannt bleiben. Die niedrigere Sensitivität des QG-MPH kann einen Nachteil gegenüber der konventionellen hochsensitiven HPV-Testung darstellen. Allerdings ist aus Analysen der E7 Onkogenexpressionsstärke, der Biomarkerexpression und der Verteilung von mehr oder weniger karzinogenen HPV Genotypen bei den Verpassten CIN2+ gegenüber den durch

QG-MPH detektierten CIN2+ Dysplasien ein deutlicher Unterschied zu sehen (Daten nicht gezeigt). Bei den falsch-negativen Dysplasien sind die Expressionswerte deutlich geringer und es finden sich hauptsächlich wenig karzinogene HPV Genotypen. Das Gegenteil ist bei den detektierten Dysplasien der Fall. In weiteren Studien muss untersucht werden, ob sich diese Beobachtungen bestätigen. Möglicherweise handelt es sich um zervikale Läsionen, die ohne Therapie regredient sind und somit auch undetektiert bleiben können, ohne eine Progression zum invasiven Karzinom befürchten zu müssen. Dazu kann nur eine longitudinale Beobachtungsstudie mit untherapierten Dysplasien (CIN2) einen Beweis liefern. (119)

5.2 QG-MPH risk score – besser als konventionelle HPV-Tests?

Entscheidend für die Etablierung des QG-MPH als Triage-Test oder auch im Einsatz eines Primärscreeningprogramms, ist seine Gesamtleistung im Vergleich zu einem herkömmlichen Screening mittels HPV-Testung und/oder Zytologie. Die vorliegende Arbeit konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass der QG-MPH einen Schritt in die Richtung eines molekularen profiling mit dem Mehrwert diagnostischer Information aufzeigt.

Er ermöglicht unter Zuhilfenahme der Biomarkerexpressionsbestimmung eine differenzierte Aussage über den Schweregrad einer zervikalen Läsion. In den drei verschiedenen risk scores wird dabei angegeben, ob eine Läsion CIN2+, CIN3+, oder sogar ein invasives Karzinom vorliegt. Im Unterschied muss bei HPV-Testung und konventioneller Zytologie bei positivem Ergebnis eine Abklärungsdiagnostik mittels Kolposkopie folgen. Die risk scores des QG-MPH geben direkt Aufschluss, ob eine behandlungsbedürftige Läsion vorliegt, mit in etwa 80% Akkuratheit des Ergebnisses. Damit würde die Zwischenstufe einer Abklärungsdiagnostik nicht mehr benötigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von 63 Proben von Patientinnen mit histologisch gesicherter CIN2+ insgesamt 49 (77,9%) Patientinnen durch den QG-MPH detektiert. Insbesondere wurden alle 6 (100%) eingeschlossenen Zervixkarzinome erkannt. Darüber hinaus wurde ein weiterer, nicht HPV-assoziiertes Tumor durch den QG-MPH Test aufgrund der HPV-unabhängigen Biomarkerexpression von Karzinommarkern detektiert. Dieser Tumor wurde von keinem der anderen Vergleichstests detektiert. Die Proben von

Patientinnen mit histomorphologisch diagnostizierten CIN1 und CIN2 wurden vermehrt durch die errechneten risk scores überbewertet (65,2% überbewertet für CIN1 und 85,7% für CIN2) als höhergradige Dysplasien. Eine mögliche Erklärung für die Über- bzw. Unterbewertung durch den risk score ist die unterschiedliche Physiologie bei gleicher Morphologie. (120) Die Stufen des risk score verwenden jeweils unterschiedliche Biomarkersets. In Abbildung 16 sind die drei risk Scores aufgeführt mit den jeweils relevanten Biomarkern für den jeweiligen Score unterhalb angegeben. Es wird ersichtlich, dass die AUC (= Akkuratheit von Sensitivität und Spezifität) v.a. durch die höhere Spezifität erreicht wird.

Die zervikale Progression ist ein Kontinuum, da die verschiedenen Schritte der Karzinogenese und Transformation gleitend sind.

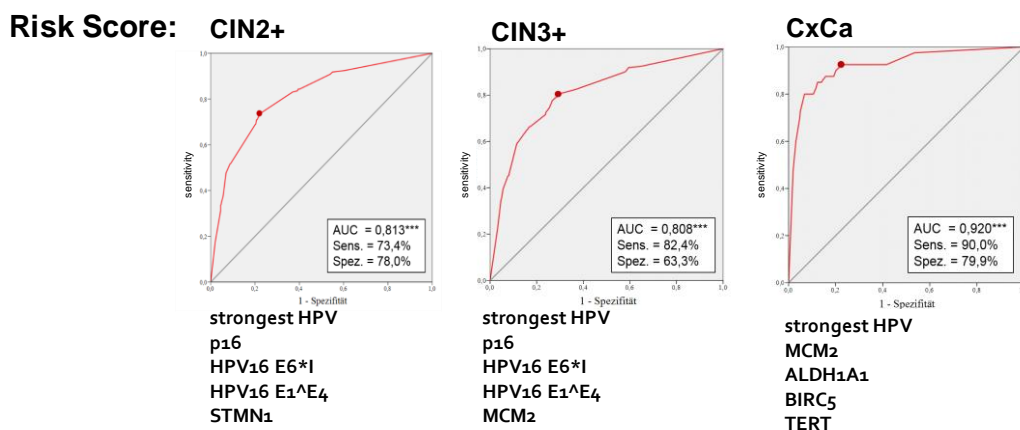


Abbildung 76 – Receiver operating characteristic (ROC) Analyse der Aussagekraft und Genauigkeit der QG-MPH Risk Scores. Jeweils die Werte von 5 Biomarkern fließen in die Risk Score Berechnung für den jeweiligen Dysplasiegrad ein. Die Flächengröße von > 80% steht für eine gute Akkuratheit der Testung, d.H. hohe Testgenauigkeit die Erkrankte und Gesunde jeweils richtig einordnet. AUC, area under the curve; Sens., Sensitivität; Spez., Spezifität

modifiziert nach M. Basten (120)

Ein positives HPV-Ergebnis verursacht sehr viele negative Folgeerscheinungen und Konsequenzen – dabei liegt bei einem positiven HPV-Test im Probenkollektiv nur bei 44% der Fälle (58 Patientinnen von 133 HPV positiven Fällen) auch eine behandlungsbedürftige Läsion vor.

Der QG-MPH bietet hier wichtige Vorteile durch eine direkte Triage der Patientinnen. In HIC könnte hier der bestehende Screeningalgorithmus durch eine Ergänzung mit QG-

MPH eine wichtige Verbesserung erfahren und die kolposkopische Abklärungsraten senken. (50)

In LMIC könnte der QG-MPH als Primärscreeningtest eingesetzt werden, da diese Länder nicht über die nötigen Ressourcen und nur begrenzte medizinische Infrastruktur verfügen. Damit ist es nicht möglich die notwendige kolposkopische Abklärung, bei einem HPV-basierten Screeningmodell zu ermöglichen. Für eine flächendeckende Versorgung mit Zytologie, HPV-PCR Testung und insbesondere der notwendigen kolposkopischen Abklärungsmöglichkeiten sind diese Regionen nicht ausgestattet. Daher wäre QG-MPH für ein Primärscreening mittels optimal geeignet. In diesen Ländern ist eine hohe Anzahl an Patientinnen zur Abklärung mittels Kolposkopie schlichtweg nicht realistisch, da die Prävalenz von HPV 2-3fach höher als auf der nördlichen Hemisphäre ist. (121) Sofern in diesen Ländern keine Zytologie zur Verfügung steht, müssten entsprechend alle HPV positiven Patientinnen kolposkopisch abgeklärt werden. In diesen Ländern ist der QG-MPH im Vergleich zu konventioneller HPV-Testung überlegen.

5.3 Kostenanalyse – welches Modell ist volkswirtschaftlich sinnvoll?

In den letzten Jahren sind die Kosten für den Gesundheitssektor sehr stark angestiegen. Wirtschaftliches Handeln und die Ökonomisierung der Medizin ist allgegenwärtig. Für ein effektives und gleichzeitig volkswirtschaftlich sinnvolles Gebärmutterhalskrebs-Screening sind einerseits die Gesamtkosten wichtig, die sowohl direkte Kosten für medizinische Dienstleistungen, als auch indirekte Kosten wie Produktivitätsverluste durch Krankheit und Ausfall beinhalten. Andererseits soll eine größtmögliche Qualität erreicht werden, die insbesondere auf eine hohe Wirksamkeit medizinischer Interventionen und Diagnostik abzielt.

Da ein Screeningalgorithmus in Deutschland mittels QG-MPH Assay vor allem durch die größere Spezifität den Vorteil von weniger falsch positiven Testergebnissen bietet, sollen im Folgenden nochmal die Hauptaspekte zusammengefasst werden.

Darüber hinaus erreichen die HPV vakzinierten Altersgruppen jetzt das Alter für eine Screeningteilnahme. In dieser Population wird die Prävalenz von Dysplasien zurückgehen. (122) Hier ist es besonders wichtig, dass das Screening mit einer guten Spezifität arbeitet, sodass die verminderte Anzahl an Dysplasien wirtschaftlich und ohne mehr Schaden für gesunde Frauen durch falsch-positive Ergebnisse erkannt werden.

Tatsächliche Gesamtkosten

Die Kosten für ein Screeningsystem sind sehr komplex und abhängig von sehr vielen unterschiedlichen Faktoren. In Abschnitt 4.3 ist hierzu die Vergütung der einzelnen Leistungen im Zusammenhang mit dem Zervixkarzinomscreening in Deutschland aufgelistet, sowie eine Übersicht zu den Kosten für die Testung mittels QG-MPH Assay zusammengestellt.

Es zeigt sich hier ein Kostenvorteil im Vergleich zu einem HPV-basierten Screeningmodell, einem Zytologie-basierten Screeningmodell, als auch einem Co-Testing Modell mit beiden genannten Verfahren. Die vorliegende Arbeit konnte aufzeigen, dass die Kosten für eine einzelne QG-MPH Messung bei ca. 22 Euro aktuell liegen (Abschnitt 4.3). Wenn man diese Kosten vergleicht mit den Kosten von ca. 145 Euro für die Durchführung einer Kolposkopie (inkl. Zytologie, Biopsie, Histologie und Versandpauschale) wird ein erhebliches Einsparpotenzial ersichtlich. Darüber hinaus bleibt der Patientin die Angst vor einer weiteren, invasiven Diagnostik durch eine Kolposkopie erspart. (123)

Eine zweite Überlegung ist die Einführung eines Gebärmutterhalskrebscreenings mittels QG-MPH in einem LMIC. Hier ist die Einführung besonders sinnvoll, da die Ressourcen für eine effektive Abklärung von Patientinnen durch eine Kolposkopiesprechstunde schlichtweg fehlen bzw. Patientinnen häufig eine solche Untersuchung ablehnen. (124) In diesen Ländern gibt es häufig keinerlei Screening und die Mittel sowie die Logistik fehlen für die Einführung einer flächendeckenden Zytologie, HPV-Testung oder kolposkopischen Abklärung. In diesem Setting könnte die Implementierung von QG-MPH eine effiziente Methode sein.

5.4 Die Pathologie als Goldstandard – ist das weiterhin zeitgemäß?

Die Pathologie gilt seit jeher als absoluter Goldstandard in der Medizin und ist in dieser Hinsicht kaum infrage gestellt worden. In den vergangenen Jahren werden jedoch erste Zweifel laut, dass auch die Ergebnisse und Befunde der Pathologie nicht als definitive Wahrheit zu betrachten sind. Die Diagnose selbst basiert letztlich auf der subjektiven Einschätzung eines Pathologen, der sich anhand verschiedener Kriterien oftmals zwischen zwei Dysplasiegraden entscheiden muss. Die Kriterien dafür scheinen zwar auf den ersten Blick objektiv, jedoch sind diese immer nur in einer Gesamtbetrachtung des Zellbildes relevant. Es gibt daher nicht immer eine völlig eindeutige Histologie und folglich ist die Pathologie nicht ohne Fehler. (125) Darüber hinaus kann es bei der bioptischen Sicherung auch zur Gewebeprobeabnahme an einer falschen Stelle kommen, sodass die Dysplasie oder das *puncto maximum* nicht erfasst wird und folglich ein falsches histologisches Ergebnis vorliegt. In jedem Fall muss zukünftig der bislang geltende Goldstandard der Pathologie weiter untersucht und kritisch betrachtet werden.

Die moderne Molekularpathologie verändert mit Biomarkern die Medizin. Dieser Trend zeigt sich sehr gut am Beispiel des QG-MPH. Das Testverfahren basiert nicht auf einem einzigen Parameter, sondern setzt sich aus mehreren verschiedenen Markern zusammen. Dabei wird die Zellphysiologie analysiert und nicht wie in der klassischen Pathologie die Morphologie von einem Zellverband. Dabei sind die Messergebnisse objektiv und stehen im Gegensatz zu der subjektiven Einschätzung von histologischen Biopsien unter dem Mikroskop.

5.5 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit umfasst ein selektiertes Probenkollektiv für Dysplasiebefunde mit histologischem Ergebnis einer größer angelegten Studie, wodurch das selektierte Probenkollektiv dieser Arbeit keine allgemeinen Schlüsse auf die zugrundeliegende Gesamtpopulation der Bevölkerung zulässt. Es handelt sich um 162 Proben von insgesamt 699 Probandinnen in der Studie. Darüber hinaus handelt es sich bei der Studienpopulation nicht um eine repräsentative Stichprobenmenge der Bevölkerung.

5.6 Zusammenfassung und Ausblick auf die Zukunft des QG-MPH und dem Screening auf Gebärmutterhalskrebs

Die Entwicklung des QG-MPH Testsystems ist ein wichtiger Schritt in Richtung einer molekularen multiplexed profiling Diagnostik, welche ein umfassendes Ergebnis und damit ein personalisiertes Vorgehen erlaubt. Sicherlich ist diese Innovation in der Lage den aktuellen Screeningalgorithmus zur Früherkennung von Gebärmutterhalskrebs in Deutschland zu ergänzen und zu verbessern.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mit dem QG-MPH ein Ergebnis nach wenigen Tagen vorliegen kann. Im Unterschied beansprucht die Verwendung von Zytologie, HPV-Testung und Kolposkopie in der Regel mehrere Wochen bis zum Vorliegen einer abschließenden Diagnose. Mit Verwendung des QG-MPH erhält man über die Biomarker direkt eine Diagnose und auch den entsprechenden Schweregrad und kann anschließend gezielt eine eventuell notwendige Therapie einleiten, ohne Zeitverlust, mehrfache Behandlungen oder weiterer Diagnostik. Es handelt sich um einen einzigen Test, der bereits Aufschluss über die Diagnose geben kann. Bei konventioneller Verwendung von HPV und Zytologie sind darüber hinaus die Kolposkopie und Histologie für eine Diagnose notwendig.

Insbesondere in Zukunft in geimpften Kohorten ist der Einsatz des QG-MPH noch sinnvoller, da er spezifischer ist als konventionelle Screeningmethoden. Darüber hinaus werden auch seltene, HPV-negative Karzinome durch den QG-MPH gefunden. Diese würden erst bei klinischen Symptomen auffallen, da sie durch eine HPV-Testung nicht erkannt werden. Zu diesem Zeitpunkt ist der Tumor meist schon weit fortgeschritten und selten heilbar.

Diese Vorteile bekommt man zudem bei gleichzeitig niedrigeren Gesamtkosten im Vergleich zu einer Testung mittels Zytologie, HPV-Testung und Kolposkopie. Neben einer Verbesserung von Screeningalgorithmen in den HIC ist der QG-MPH Test geeignet ein umfassendes dezentralisiertes Screening, als point-of-care Test und mit umfassendem Ergebnis und Behandlungsentscheidung zu ermöglichen, was die meisten strukturellen Probleme in den LMIC beseitigen könnte.

Literaturverzeichnis

1. **Pickel H, Winter R, Young R H.** History of Gynecological Pathology. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2009, 28 (2): 103-106.
2. **Ruge C, Veit J.** Der Krebs der Gebärmutter. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1882, 7: 378-379.
3. **Lowy I.** A Woman's Disease - The history of cervical cancer. *Oxford University Press*. 2011.
4. **Papanicolaou G N, Traut H F.** The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol*. 1941; 42(2) : 193-206.
5. **Papanicolaou G N, Traut H F.** Cancer of the uterus: The vaginal smear in its diagnosis. *Cal West Med*. 1943, Vols. 59: 121-122.
6. **Papanicolaou G N.** New cancer diagnosis. in: *Proceedings of the Third Race Betterment Conference*. 1928: 528-534.
7. **Hinselmann H.** Verbesserung der Inspektionsmöglichkeiten von Vulva- Portio und Vagina. *Hamburg: Hartung*; 1925.
8. **Hinselmann H.** Einführung in die Kolposkopie. *Hamburg: Hartung*; 1933.
9. **Kühn W, Gieseck F, Küppers V, Lellé R J, Menton M.** DGGG-Vorstandsbeschluss aus Anlass der Diskussion um Hans Hinselmann. *Frauenarzt* 56. 2015; 15(4) : 300-303.
10. **Vercellino G F, Erdemoglu E, Chiantera V.** Validity of the colposcopic criteria inner border sign, ridge sign, and rag sign for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol*. 2013 Mar; 121(3) : 624-631.
DOI:10.1097/AOG.0b013e3182835831.
11. **Lellé R J, Küppers V.** Kolposkopie in der Praxis. 2. Auflage. Springer; 2018.
12. **Zur Hausen H.** Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Research*. 1976; 36(2) : 794, 1976.
13. **Zur Hausen H.** Papillomaviruses in human cancer. *Appl. Pathology*. 1987; 19-24.
14. **Gasparini R, Panatto D.** Cervical cancer: from Hippocrates through Rigoni-Stern to zur Hausen. *Vaccine*. 2009 May; 27(1): A4-5. DOI:10.1016/j.vaccine.2008.11.069.
15. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008** [Internet]. Version 2022 [zitiert 22. September 2022]. Verfügbar unter:
www.nobelprize.org/prizes/medicine/2008/summary/

16. **Gustafsson L, Pontén J, Zack M, Adami H O.** International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening. *Cancer Causes and Control*. 1997 Sep; 8(5): 755-763. DOI:10.1023/a:1018435522475.
17. **Gustafsson L, Tontén J, Bergström R, Adami H O.** International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening. *International J. Cancer*. 1997 Apr; 71(2): 159-165. DOI:10.1002/(sici)1097-0215(19970410)71:2<159::aid-ijc6>3.0.co;2-#.
18. **Becker N.** Epidemiological aspects of cancer screening in Germany. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Dec; 129(12): 691-702. DOI:10.1007/s00432-003-0494-y. Epub 2003 Oct 14.
19. **Becker N, Altenburg H, Stegmaier C, Ziegler H.** Report on trends of incidence (1979-2002) of and mortality (1952-2002) from cancer in Germany. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007 Jan; 133(1): 23-35. DOI:10.1007/s00432-006-0142-4. Epub 2006 Aug 3.
20. **Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L.** Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Feb; 8(2): 191-203. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30482-6. Epub 2019 Dec 4.
21. **De Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford G M.** Globale Krebslast aufgrund von Infektionen im Jahre 2018: eine weltweite Inzidenzanalyse. *Lancet Glob Health*, 2020 Feb; 8(2): 180-192. DOI:10.1016/S2214-109X(19)30488-7. Epub 2019 Dec 17.
22. **De Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford G M.** Globale Krebslast aufgrund von Infektionen im Jahre 2018: eine weltweite Inzidenzanalyse. *Lancet Glob Health*, 2020 Feb; 8(2): 180-192. DOI:10.1016/S2214-109X(19)30488-7. Epub 2019 Dec 17.
23. **Coleman M P, Estève J, Demiecki P, Arslan A, Renard H.** Trends in cancer incidence and mortality. *IARC Sci Publ*. 1993; 121: 1-806. DOI: 10.3109/9780415874984-2.
24. **Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten.** Krebs in Deutschland [Internet]. 2018/2019 [zitiert: 22. September 2022]. Verfügbar unter: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Gebaermutterhalskrebs/gebae rmutterhalskrebs_node.html
25. **Zur Hausen H.** Papillomaviruses in human cancer. *Appl. Pathology*. 1987; 5(1): 19-24, 1987.

26. **(WHO), World Health Organization.** *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.* Lyon; 2007.
27. **Bernard H U, Burk R D, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers E-M:.** Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic . *Virology.* 2010 May 25; 401(1): 70-79.
DOI:10.1016/j.virol.2010.02.002. Epub 2010 Mar 5.
28. **Buck C B, Cheng N, Thompson C D.** Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virology.* 2008 Jun; 82(11): 5190-5197.
DOI:10.1128/JVI.02726-07. Epub 2008 Mar 26.
29. **Meisels A, Fortin R.** Condylomatous lesions of the cervix and vagina. *Acta Cytol.* 1976 Nov-Dez; 20(6): 505-509.
30. **Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I.** Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology.* 2015 Mar; 25(1) : 2-23. DOI:10.1002/rmv.1822.
31. **Cogliano V, Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, Ghissassi F E.** Carcinogenicity of combined oestrogen-progestagen contraceptives and menopausal treatment. *The Lancet Oncology.* 2005 Aug; 6(8): 552-553. DOI:10.1016/s1470-2045(05)70273-4.
32. **Narechania A, Chen Z, DeSalle R, Burk R D.** Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human papillomaviruses . *J Virol.* 2005 Dec; 79(24): 15503-15510. DOI:10.1128/JVI.79.24.15503-15510.2005
33. **Gross G, Jablonska S, Pfister H, Stegner H E.** Genital Papillomavirus Infections. *Berlin Heidelberg New York: Springer.* 1990.
34. **Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch H G, zur Hausen H.** Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. . *Proc Nat Acad Sci USA.* 1983 Jan; 80(2): 560-563. DOI:10.1073/pnas.80.2.560.
35. **Klug S J, Hukelmann M, Hollwitz B.** Prevalence of human papillomavirus types in women screened by cytology in Germany. *J Med Virol.* 2007 May; 79(5): 616–625. DOI:10.1002/jmv.20863.
36. **Iftner T, Eberle S, Iftner A.** Prevalence of low-risk and high-risk types of human papillomavirus and other risk factors for HPV infection in Germany within different age groups in women up to 30 years of age: an epidemiological observational study. *J Med Virol.* 2010 Nov; 82(11): 1928–1939. DOI:10.1002/jmv.21910.

37. **Deleré Y, Renschmidt C, Kaufmann A M.** Human Papillomavirus prevalence and probable first effects of vaccination in 20 to 25 year-old women in Germany: a population-based cross-sectional study via home-based self-sampling. *BMC Infect Dis.* 2014 Feb 19; 14: 87. DOI:10.1186/1471-2334-14-87.
38. **Li Y, Xu C.** Human Papillomavirus-Related Cancers. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 1018: 23-34. DOI:10.1007/978-981-10-5765-6_3.
39. **De Sanjose S, Quint W G, Alemany L.** Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional world wide study. *The lancet oncology.* 2010 Nov; 11(11): 1048-1056. DOI:10.1016/S1470-2045(10)70230-8. Epub 2010 Oct 15.
40. **Von Knebel Doeberitz M, Vinokurova S.** Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res.* 2009 Aug; 40(6): 435-442. DOI:10.1016/j.arcmed.2009.06.002. Epub 2009 Sep 5.
41. **Kines R C, Thompson C D, Lowy D R, Schiller J T, Day P M.** The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Dec 1; 106(48): 20458-20463. DOI:10.1073/pnas.0908502106. Epub 2009 Nov 17.
42. **Von Knebel Doeberitz M, Vinokurova S.** Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res.* 2009 Aug; 40(6): 435-442. DOI:10.1016/j.arcmed.2009.06.002. Epub 2009 Sep 5.
43. **Zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm G W.** Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974 May 15; 13(5): 650-656. DOI:10.1002/ijc.2910130509.
44. **(FDA), Food and Drug Administration.** Human papillomavirus vaccine [Internet]. 2020 [zitiert: 22. September 2022]. Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/approved-vaccine-products/human-papillomavirus-vaccine>
45. **Arbyn M, Xu L, Simoens C, Martin-Hirsch P P.** Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 May 9; 5(5): CD009069. DOI:10.1002/14651858.CD009069.pub3.
46. **(STIKO), Ständige Impfkommision.** *Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren.* Berlin : Robert Koch Institut; 2018 (28.6.2018).

47. **(STIKO), Ständige Impfkommision.** *Empfehlungen der Ständigen Impfkommision.* Berlin : Robert Koch Institut; 2014.
48. **(RKI), Robert Koch Institut.** Impfstatus der Kinder und Jugendlichen in Deutschland, STIKO: Influenzaimpfungen in der COVID-19-Pandemie [Internet]. 2020 [zitiert 22. September 2022]. Verfügbar unter:
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2020/Ausgaben/32-33_20.pdf?__blob=publicationFile
49. **Wähner C.** HPV vaccination uptake in boys after introduction of gender-neutral HPV-vaccination in Germany – a retrospective database analysis (IMS® Vaccine Analyser). *virtuelle Konferenz: IPVC 2021*, 15.-19. November 2021.
50. **(G-BA), Gemeinsamer Bundesausschuss.** Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Krebsfrüherkennungs-Richtlinie und eine Änderung der Richtlinie für organisierte Krebsfrüherkennungsprogramme: Programm zur Früherkennung von Zervixkarzinomen. Berlin : s.n.; 2018. 22. November 2018.
51. **Arbyn M.** Zusammenstellung: Evidenzberichte und Zusatzmaterialien von M. Arbyn et al. für die Leitliniengruppe Prävention des Zervixkarzinoms [Internet]. Frankfurt a. M. : AWMF - Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. 2021 [zitiert 22. September 2022]. Verfügbar unter:
https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-027OLe1_Praevention_Zervixkarzinom_2018-01-verlaengert.pdf
52. **(G-BA), Gemeinsamer Bundesausschuss.** *Beschluss: Änderung der Richtlinie für organisierte Krebsfrüherkennungsprogramme: Programm zur Früherkennung von Zervixkarzinomen.* Berlin: s.n.; 22. November 2018.
53. **(WHO), World Health Organisation.** *Global Strategy for cervical cancer elimination.* Genf : WHO; 2020.
54. **(G-BA), Gemeinsamer Bundesausschuss.** *Bekanntmachung eines Beschlusses des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen.* In: G-BA. Banz; Berlin: 2005. S.192, (S.14_983).
55. **Griesser H, Marquardt K, Jordan B, Küppers V, Gieseking F, Kühn W.** Das Prozedere bei auffälligen Befunden Addendum zur Münchner Nomenklatur III. *Frauenarzt.* 2015 Jan; 56(1): 10-13.
56. **Clad A, Reuschenbach M, Weinschenk J, Grote R, Rahmsdorf J, Freudenberg N.** Performance of the Aptima High-Risk Human Papillomavirus mRNA Assay in a

Referral Population in Comparison with Hybrid Capture 2 and Cytology. *JCM*. 2011 Mar; 49(3): 1071-1076. DOI:10.1128/JCM.01674-10. Epub 2010 Dec 29.

57. **Petry K-U, Menton S, Menton M.** Inclusion of HPV-testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer*. 2003 May 19; 88(10): 1570-1577. DOI:10.1038/sj.bjc.6600918.

58. **Bastian L, Datta S, Hasselblad V.** Evaluation of Cervical Cytology. Evidence Reports/Technology Assessments. *Agency for Health Care Policy and Research (US), Rockville*. 1999 Jan; (5): (Report No.: 99-E010).

59. **Coste J, Cochand-Priollet B, de Cremoux P.** Cross sectional study of conventional cervical smear, monolayer cytology, and human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening. *BMJ*. 2003 Apr 5; 326(7392): 733-740. DOI: 10.1136/bmj.326.7392.733.

60. **Mayrand M, Duarte-Franco E, Rodrigues I.** Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou Screening Tests for Cervical Cancer. *New England Journal*. 2007 Oct 18; 357(16): 1579-1588. DOI:10.1056/NEJMoa071430.

61. **Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskevaidis E.** Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecologic Oncology*. 2007 Jan; 104(1): 232-246. DOI: 10.1016/j.ygyno.2006.08.053. Epub 2006 Nov 3.

62. **Bastian L, Datta S, Hasselblad V.** Evaluation of Cervical Cytology. Evidence Reports/Technology Assessments. *Agency for Health Care Policy and Research (US), Rockville*. 1999 Jan; (5): (Report No.: 99-E010).

63. **Clavel C, Masure M, Bory J.** Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer*. 2001 Jun 15; 84(12): 1616–1623. DOI:10.1054/bjoc.2001.1845.

64. **Cuzick J, Szarewski A, Cubie H.** Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *THE LANCET*. 2003 Dec 6; 362(9399):1871–1876. DOI:10.1016/S0140-6736(03)14955-0.

65. **Rebolj M, Lynge E, Bonde J.** Human papillomavirus testing and genotyping in cervical screening. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011 Jul; 11(7): 1023-31. DOI: 10.1586/era.11.84.

66. **Rossi P G, Rebolj M.** HPV mRNA testing in cervical cancer screening. *Lancet Oncol*. 2022 Oct; 23(10): e436. DOI: 10.1016/S1470-2045(22)00486-7.

- 67. Doorbar J.** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006 May; 110(5): 525–541. DOI:10.1042/CS20050369.
- 68. Meijer C J, Berkhof J, Castle P E.** Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009 Feb 1; 124(3): 516-520. DOI:10.1002/ijc.24010.
- 69. Onkologie, S3-Leitlinie Leitlinienprogramm. Prävention des Zervixkarzinoms.** Erstveröffentlichung 12/2017. Version 1.1 - 03.2020 - AWMF-Registernummer 015/027OL.
- 70. (G-BA), Gemeinsamer Bundesausschuss.** Zusammenfassende Dokumentation zum Beraterverfahren des G-Ba über eine Änderung der Krebsfrüherkennungs-Richtlinie (...): Programm zur Früherkennung von Zervixkarzinomen [Internet]. 21. Mai 2019. Verfügbar unter: https://www.g-ba.de/downloads/40-268-6117/2018-11-22_oKFE-RL_Zervixkarzinom_ZD.pdf
- 71. Nauth H F.** *Gynäkologische Zytodiagnostik*. Stuttgart: Thieme; 2013.
- 72. Hinselmann H.** Die Essigsäureprobe ein Bestandteil der erweiterten Kolposkopie. *Dtsch Med Wschr*. 1938 Jan 7; 64(2): 40-42. DOI:10.1055/s-0028-1122010.
- 73. Schiller W.** Zur klinischen Frühdiagnose des Portiocarcinoms. *Zbl Gynäk*. 1886, 1928.
- 74. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D.** PALMS (Primary ASC-US LSIL Marker Study). *J Natl Cancer Inst*. 2013 Oct 16; 105(20): 1550-1557. DOI: 10.1093/jnci/djt235. Epub 2013 Oct 4.
- 75. Yamato K, Yamada T, Kizaki M.** New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV 16 positive cervical cancer. *Cancer Gene Ther*. 2008 Mar; 15(3): 140–153. DOI:10.1038/sj.cgt.7701118. Epub 2007 Dec 21.
- 76. Pal A, Kundu R.** Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol*. 2020 Jan 21; 10: 3116. DOI:10.3389/fmicb.2019.03116.
- 77. Scheffner M, Werness B A, Huibregtse J M, Levine A J, Howley P M.** The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990 Dec 21; 63(3): 1129–1136. DOI:10.1016/0092-8674(93)90384-3.
- 78. Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, Clavel C, Gissmann L, Pawlita M.** Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns.

Cancer Res. 2010 Jan 1; 70(1): 249-256. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-2514. Epub 2009 Dec 22.

79. Athanasoula K, Gogas H, Polonifi K, Vaiopoulos A G, Polyzos A, Mantzourani M. Survivin beyond physiology: orchestration of multistep carcinogenesis and therapeutic potentials. *Cancer Lett.* 2014 Jun 1; 347(2): 175-182. DOI:10.1016/j.canlet.2014.02.014.

80. Fan Y, Chen J. Clinicopathological significance of survivin expression in patients with cervical cancer: A systematic meta-analysis. *Bioengineered.* 2017 Sep 3; 8(5): 511–523. DOI:10.1080/21655979.2016.1252879. Epub 2017 Jan 4.

81. Vinothkumar V, Arunkumar G, Revathidevi S. TERT promoter hot spot mutations are frequent in Indian cervical and oral squamous cell carcinomas. *Tumour Biol.* 2016; 37(6): 7907-7913. DOI:10.1007/s13277-015-4694-2. Epub 2015 Dec 23.

82. Lane D P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992 Jul 2; 358(6381): 15-16. DOI:10.1038/358015a0.

83. Scheffner M, Werness B A, Huibregtse J M, Levine A J, Howley P M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990 Dec 21; 63(3): 1129–1136. DOI:10.1016/0092-8674(93)90384-3.

84. Schmidt D, Bergeron C, Denton K J, Ridder R, European CINtec Cytology Study Group. EEMAPS (European Equivocal or Mildly Abnormal Pap Cytology Study). *Cancer Cytopathol.* 2011 Jun 25; 119(3):158-166. DOI: 10.1002/cncy.20140. Epub 2011 Mar 25.

85. Da Mata S, Ferreira J, Nicolás I. P16 and HPV Genotype Significance in HPV-Associated Cervical Cancer-A Large Cohort of Two Tertiary Referral Centers. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar; 22(5): 2294. DOI: 10.3390/ijms22052294. Epub 2021 Feb 25.

86. McLaughlin-Drubin M E, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology.* 2009 Feb 20; 384(2): 335-344. DOI: 10.1016/j.virol.2008.10.006. Epub 2008 Nov 12.

87. Carreras R, Alameda F, Mancebo G. A study of Ki-67, c-erbB2 and cyclin D-1 expression in CIN-I, CIN-III and squamous cell carcinoma of the cervix. *Histol Histopathol.* 2007 Jun; 22: 587–592. DOI:10.14670/HH-22.587.

88. Iaconis L, Hyjek E, Ellenson L H, Pirog E C. p16 and Ki-67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix: correlation with human

papillomavirus detection. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Sep; 131(9): 1343–1349. DOI: 10.5858/2007-131-1343-PAKIIA.

89. Howitt B E, Nucci M R, Drapkin R, Crum CP, Hirsch M S. Stathmin-1 expression as a complement to p16 helps identify high-grade cervical intraepithelial neoplasia with increased specificity. *Am J Surg Pathol*. 2013 Jan; 37(1): 89-97. DOI:10.1097/PAS.0b013e3182753f5a.

90. Xi W, Rui W, Fang L. Expression of stathmin/op18 as a significant prognostic factor for cervical carcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009; 135: 837–846. DOI:10.1007/s00432-008-0520-1. Epub 2008 Nov 26

91. Kaur G, Balasubramaniam S D, Lee Y J, Balakrishnan V, Oon C E. Minichromosome Maintenance Complex (MCM) Genes Profiling and MCM2 Protein Expression in Cervical Cancer Development. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019 Oct 1; 20(10): 3043–3049. DOI:10.31557/APJCP.2019.20.10.3043.

92. Zuberi Z, Mremi A, Chilongola J O, Semango G, Sauli E. Expression analysis of p16 and TOP2A protein biomarkers in cervical cancer lesions and their correlation with clinico-histopathological characteristics in a referral hospital, Tanzania. *PLoS ONE*. 2021 Oct 27; 16(10): e0259096. DOI:10.1371/journal.pone.0259096.

93. Escobar-Hoyos L F, Yang J, Zhu J. Keratin 17 in premalignant and malignant squamous lesions of the cervix: proteomic discovery and immunohistochemical validation as a diagnostic and prognostic biomarker. *Mod Pathol*. 2014 Apr; 27(4): 621-630. DOI:10.1038/modpathol.2013.166. Epub 2013 Sep 20.

94. Herfs M, Parra-Herran C, Howitt B E. Cervical squamocolumnar junction-specific markers define distinct, clinically relevant subsets of low-grade squamous intraepithelial lesions. *Am J Surg Pathol*. 2013 Sep; 37(9): 1311-1318. DOI:10.1097/PAS.0b013e3182989ee2.

95. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *National Cancer Institute*. 2012 Jun 26; 109(26): 10516-10521. DOI:10.1073/pnas.1202684109. Epub 2012 Jun 11.

96. Houghton O, McCluggage W G. The expression and diagnostic utility of p63 in the female genital tract. *Adv Anat Pathol*. 2009 Sep; 16(5): 316-321. DOI:10.1097/PAP.0b013e3181b507c6.

- 97. Steurer S, Riemann C, Büscheck F.** p63 expression in human tumors and normal tissues: a tissue microarray study on 10,200 tumors. *Biomark Res.* 2021 Jan 25; 9(1): 7. DOI:10.1186/s40364-021-00260-5.
- 98. Li Z, Chen J, Zhao S.** Discovery and validation of novel biomarkers for detection of cervical cancer. *Cancer Med.* 2021 Mar; 10(6): 2063–2074. DOI:10.1002/cam4.3799. Epub 2021 Feb 23.
- 99. Tulake W, Yuemaier R, Sheng L.** Upregulation of stem cell markers ALDH1A1 and OCT4 as potential biomarkers for the early detection of cervical carcinoma. *Oncol Lett.* 2018 Nov; 16(5): 5525-5534. DOI:10.3892/ol.2018.9381. Epub 2018 Sep 3.
- 100. Steinau M, Rajeevan M S, Unger E R.** DNA and RNA references for qRT-PCR assays in exfoliated cervical cells. *J. Mol. Diagn.* 2006 Feb; 8(1): 113-118. DOI:10.2353/jmoldx.2006.050088.
- 101. Sharan R N, Vaiphei S T, Nongrum S, Keppen J, Ksoo M.** Consensus reference gene(s) for gene expression studies in human cancers: end of the tunnel visible? *Cell Oncol (Dordr).* 2015 Dec; 38(6): 419-431. DOI:10.1007/s13402-015-0244-6. Epub 2015 Sep 18.
- 102. Schmitt M, Bravo I G, Snijders P J, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T.** Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2006 Feb; 44(2): 504-512. DOI:10.1128/JCM.44.2.504-512.2006.
- 103. Skof A S, Rotenberg L, Hannemann P V F, Thies S, Boschetti-Grützmacher E, Kaufmann A M.** Human Papillomavirus E7 and p16INK4a mRNA Multiplexed Quantification by a QuantiGene™ Proof-of-Concept Assay Sensitive Detects Infection and Cervical Dysplasia Severity. *Diagnostics (Basel).* 2023 Mar 16; 13(6): 1135. DOI:10.3390/diagnostics13061135.
- 104. Dabeski D, Duvlis S, Basheska N.** Comparison Between HPV DNA Testing and HPV E6/E7 MRNA Testing in Women with Squamous Cell Abnormalities of the Uterine Cervix. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki).* 2019 May 1; 40(1): 51-58. DOI:10.2478/prilozi-2019-0003.
- 105. Dalgaard P.** R 4.2.1 is released [Internet]. 23. Juni 2022 [zitiert: 29. Juni 2022]. Verfügbar unter: <https://stat.ethz.ch/pipermail/r-announce/2022/000685.html>
- 106. Wojcinski M.** 14 Jahre HPV-Impfung: was haben wir erreicht? *Gynakologe.* 2021; 54(11): 801–809. DOI:10.1007/s00129-021-04869-3. Epub 2021 Oct 13.
- 107. Reuschenbach M, Stephan A J, Saxena K.** Burden of CIN2+ diagnoses and conizations in women aged 18–45 years—a retrospective secondary data analysis of

German statutory health insurance claims data. *Arch Gynecol Obstet.* 2022 Dec; 306(6): 2077-2092. DOI:10.1007/s00404-022-06548-7. Epub 2022 Apr 14.

108. Iftner T, Eberle S, Iftner A. Prevalence of low-risk and high-risk types of human papillomavirus and other risk factors for HPV infection in Germany within different age groups in women up to 30 years of age: an epidemiological observational study. *J.Med.Virol.* 2010 Nov; 82(11): 1928-1939. DOI:10.1002/jmv.21910.

109. Schneider A, Hoyer H, Lotz B. Screening for high grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for high risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer.* 2000 Nov 20; 89(6): 529-534.

110. Petry K-U, Menton S, Menton M. Inclusion of HPV-testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer.* 2003 May 19; 88(10): 1570-1577. DOI:10.1038/sj.bjc.6600918.

111. Kassenärztliche Bundesvereinigung. Online-Version des EBM. *KBV.de - Kassenärztliche Bundesvereinigung* [Internet]. Oktober 2022 [zitiert: 02. Oktober 2022]. Verfügbar unter: <https://www.kbv.de/html/online-ebm.php>

112. Koliopoulos G, Nyaga V N, Santesso N. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Aug 10; 8(8): CD008587. DOI:10.1002/14651858.

113. Liu Y, Liao J, Yi X. Diagnostic value of colposcopy in patients with cytology-negative and HR-HPV-positive cervical lesions. *Arch Gynecol Obstet.* 2022 Oct; 306(4): 1161-1169. DOI:10.1007/s00404-022-06415-5. Epub 2022 Mar 23.

114. Świdarska-Kiec J, Czajkowski K, Zaręba-Szczudlik J, Kacperczyk-Bartnik J, Bartnik P, Romejko-Wolniewicz E. Comparison of HPV Testing and Colposcopy in Detecting Cervical Dysplasia in Patients With Cytological Abnormalities. *In Vivo.* 2020 May-Jun; 34(3): 1307-1315. DOI:10.21873/invivo.11906.

115. Aleman J M, Arlien F, Tjalma W A A. The impact of conisation on pregnancy outcome. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2016; 37(6): 786-791.

116. Sroczynski G, Esteban E, Widschwendter A. Reducing overtreatment associated with overdiagnosis in cervical cancer screening-A model-based benefit-harm analysis for Austria. *Int J Cancer.* 2020 Aug 15; 147(4): 1131-1142. DOI:10.1002/ijc.32849. Epub 2020 Jan 13.

117. Loopik D L, Bentley H A, Eijgenraam M N, IntHout J, Bekkers R L M, Bentley J R. The Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grades 1, 2, and

3: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Low Genit Tract Dis*. 2021 Jul 1; 25(3): 221-231. DOI:10.1097/LGT.0000000000000604.

118. Leitlinienprogramm Onkologie - DKG, Deutsche Krebshilfe, AWMF. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom. s.l. : AWMF online, 2022. Vols. Version 2.2 - 03.2022, 032/033OL.

119. El Aliani A, El-Abid H, El Mallali Y, Attaleb M, Ennaji M M, El Mzibri M. Association between Gene Promoter Methylation and Cervical Cancer Development: Global Distribution and A Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2021 Mar; 30(3): 450-459. DOI:10.1158/1055-9965. Epub 2021 Jan 13.

120. Basten M. *mRNA-basierte Quantifizierung von Biomarkern zur Diagnostik von zervikalen intraepithelialen Neoplasien und von Zervixkarzinomen: Validierung des QuantiGene 2.0 Plex Assays*. Berlin: Monographie Dissertation Charité Berlin; 2021. HPV Forschungslabor Charité.

121. Scott-Wittenborn N, Fakhry C. Epidemiology of HPV Related Malignancies. *Semin Radiat Oncol*. 2021 Oct; 31(4): 286-296. DOI:10.1016/j.semradonc.2021.04.001.

122. Falcaro M, Castañon A, Ndlela B. 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*. 2021 Dec 4; 398(10316): 2084-2092. DOI:10.1016/S0140-6736(21)02178-4. Epub 2021 Nov 3.

123. Uner F O, Korukcu O. A prevalence and psychometric study on fear of cancer in women with abnormal cervical cytology undergoing colposcopy. *Psychooncology*. 2020 Nov; 29(11): 1850-1855. DOI:10.1002/pon.5504. Epub 2020 Aug 28.

124. Chigbu C O, Aniebue U U. Non-uptake of colposcopy in a resource-poor setting. *Int J Gynaecol Obstet*. 2011 May; 113(2): 100-102. DOI:10.1016/j.ijgo.2010.11.017. Epub 2011 Feb 23.

125. Wick M R, Marchevsky A M. Evidence-based principles in pathology: existing problem areas and the development of "quality" practice patterns. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Nov; 135(11): 1398-1404. DOI:10.5858/arpa.2011-0181-SA.

126. Papanicolaou G N. New cancer diagnosis presented at the Third Race Betterment Conference, Battle Creek, Michigan; 02.-06. Januar 1928.

127. Papanicolaou G N. New Cancer Diagnosis. *Battle Creek Med. Conference (02.-06. Januar 1928)*, Race Betterment Foundation, Battle Creek, Michigan; 1928; 528-534.

128. (RKI), Robert Koch Institut. *Impfquoten der Masern-, HPV- und Influenza-impfung in Deutschland*. s.l. : Robert Koch-Institut; 2016.

- 129. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L.** Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet - Global Health*. 2020 Feb; 8(2): e191-e203. DOI:10.1016/S2214-109X(19)30482-6. Epub 2019 Dec 4.
- 130. Griesser H, Marquardt K, Kühn W, AG-CPC.** Münchner Nomenklatur III für die gynäkologische Zytodiagnostik der Zervix ab 01. Juli 2014 [Internet] November 2013 [zitiert: 03. Juni 2022]. Verfügbar unter: <https://www.ag-cpc.de/wp-content/uploads/2018/07/131218-m-nomenklaturiii.pdf> & <https://www.ag-cpc.de/muenchen-iii/>
- 131. Gelderblom H R, (RKI), Robert Koch Institut.** Papillomavirus aus Hautwarze, Transmissions-Elektronenmikroskopie, Negativkontrastierung [Internet]. 2009 [zitiert: 26. Septemeber 2022]. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/EM/Aufnahmen/EM_Tab_HPV.html.
- 132. Woodman C B J, Collins S I, Young L S.** The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*. 2007 Jan; 7(1): 11-22. DOI:10.1038/nrc2050.
- 133. Girardi F, Tirri B, Küppers V, Menton M, Quaas J, Reich O.** Neue kolposkopische IFCPC-Nomenklatur der Cervix uteri (Rio de Janeiro 2011). *Frauenarzt* 53. 2012 Nov; 12(11): 1064-1066.
- 134. Inc., Bioscience.** User Manual 2020. *Modifiziert QuantiGene 2.0 User Manual*.
- 135. BD, USA.** BD Onclarity HPV Assay [Internet]. 2022 [zitiert: 30. September 2022]. Verfügbar unter: <https://www.bd.com/en-us/products-and-solutions/products/product-families/bd-onclarity-hpv-assay>
- 136. AG, Roche Diagnostik.** cobas® HPV Test [Internet]. 2022 [zitiert: 30. September 2022]. Verfügbar unter: <https://www.roche.de/diagnostik-produkte/produktkatalog/tests-parameter/cobas-hpv>
- 137. AG, Roche Diagnostik.** cobas® 6800 und cobas 8800 Systeme [Internet]. 2022 [zitiert: 30. September 2022]. Verfügbar unter: <https://www.roche.de/diagnostik-produkte/produktkatalog/systeme/cobas-6800-und-cobas-8800-system>.
- 138. Li Cervix Cancer Screening.** s.l. : *IARC Handbooks of Cancer Prevention, Int J Cancer*; 2011.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Maximilian Menton, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Detektion zervikaler intraepithelialer Neoplasien anhand konventioneller HPV-Testung und mRNA-Biomarker-Quantifizierung durch QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology. (engl.: Detection of cervical intraepithelial neoplasia based on conventional HPV testing compared to mRNA biomarker quantification through QuantiGene-Molecular-Profiling-Histology Assay) 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 Autorinnen und Autoren 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 Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich stehe heute hier, am Ende meiner Promotionsreise, und möchte diese Gelegenheit nutzen, um meinen tiefsten Dank an all die Menschen auszusprechen, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst gebührt mein aufrichtiger Dank meinem Doktorvater PD Dr. Andreas Kaufmann, dessen fachliche Expertise, Anleitung und unermüdliche Unterstützung mich dazu befähigt haben, diesen wichtigen Meilenstein zu erreichen. Seine Weisheit und Ermutigung waren von unschätzbarem Wert für mich. Für seine Unterstützung und seinen Einsatz werde ich immer zutiefst dankbar sein!

Ein ebenso herzlicher Dank gebührt meinen Eltern. Ihre bedingungslose Liebe, Unterstützung und Opferbereitschaft haben mir stets den Rücken gestärkt und mich ermutigt, meinen Träumen nachzugehen. Ohne ihre Unterstützung wäre dies nicht möglich gewesen. Sie sind meine größten Vorbilder!

Meiner geliebten Freundin Heide möchte ich meinen tiefsten Dank aussprechen. Deine grenzenlose Unterstützung, Liebe und Verständnis haben mich durch alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre begleitet. Du bist mein Fels in der Brandung, und ich schätze Deine Unterstützung unendlich. Dir gehört mein Herz für jetzt und immer!

An meine beste Freundin Michelle: Deine aufmunternden Worte, Deine Unterstützung und Deine unerschütterliche Freundschaft haben meinen Weg erhellt und mich gestärkt. Danke, dass du immer an meiner Seite warst. Mit Dir habe ich den allerbesten Freund für die Ewigkeit gefunden!

Meine Schwester Alyssa hat mich über viele Jahre hinweg massiv unterstützt. Ihre Ermutigung und Ratschläge haben mir unermesslich viel bedeutet und mich inspiriert, durchzuhalten. Ich bin unglaublich dankbar für die unglaubliche Unterstützung und die vielen Jahre einer einzigartigen Freundschaft.

Ein besonderer Dank gilt auch Anna und Carola, deren Zusammenarbeit, Hilfe und Freundlichkeit meine Forschung und Arbeit bereichert haben. Ihre Expertise und Unterstützung haben einen bedeutenden Beitrag zu meinem Erfolg geleistet.

Ganz besonders möchte ich meinen besten Freunden aus Berlin Dank aussprechen. Allen voran Lisa, Anne, Pinkus, Marcel, Max und Lucas; wie auch meinen ganz besonderen Freunden Raphael, Benni, Robin! Ebenso meinem geliebten Bruder Moritz und seiner Freundin Laura.

Eure moralische Unterstützung, Euer Zuspruch und Eure Freundschaft haben mein Leben auf vielfältige Weise bereichert. Danke, dass ihr in guten und schlechten Zeiten an meiner Seite steht.

Die Reise zur Promotion war geprägt von Herausforderungen, aber auch von unvergesslichen Momenten der Freude und des Wachstums. Eure Unterstützung hat mir Kraft gegeben und mich motiviert, meinen Weg fortzusetzen. Ich bin überwältigt von Eurer Großzügigkeit, Eurer Freundschaft und Eurer Liebe.

Mit aufrichtigem Dank,

Euer Max



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Name, Vorname: Menton, Maximilian
Emailadresse: maximilian.menton@charite.de
Matrikelnummer: 223842
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Andreas Kaufmann
Promotionsinstitution / Klinik: Charité Frauenklinik CVK

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

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

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



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Maximilian Menton 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: 02.06.2021*
- *Termin 2: 06.07.2021*
- *Termin 2: 09.07.2021*

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

- *Auswertung diagnostischer HPV-Tests mit Sensitivität/Spezifität/PPV/NPV/LR+/LR-*
- *Fallzahlplanung aber nur mit EINEM Wert: Spezifität.*
- *Alloyed Gold standard kann man nur diskutieren, nicht korrigieren.*

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: 20.09.2021

CHARITÉ
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie
Campus Charité Mitte
Charitéplatz
Besucheranschrift

Name der Beraterin: Anne Pohrt

Unterschrift Beraterin, Institutsstempel