

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

DISSERTATION

**Evaluation eines Selbstabnahmesets für die deutschlandweite HPV-
Prävalenzmessung mittels eines innovativen Genotypisierungstests**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elena Vartazarova
aus Tbilissi, Georgien

Datum der Promotion: 12.09.2014

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung.....	5
1.1. Papillomviren.....	5
1.1.1 Klassifikation.....	5
1.1.2 Molekularbiologie von HPV.....	5
1.1.3 Infektion und Krankheitsbilder	7
1.2 Zervixkarzinom	9
1.2.1 Epidemiologie	9
1.2.2 Entstehung des Zervixkarzinoms	10
1.2.3 Nomenklatur.....	12
1.2.4 Primäre Prävention: HPV-Impfung.....	15
1.2.5 Sekundäre Prävention	16
1.2.6 Therapie.....	18
1.3 HPV-Prävalenz und Alter.....	18
1.4 Studienkonzept.....	21
1.5 Ziele und Fragestellung	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Ein- und Ausschlusskriterien	23
2.2 Ablauf der Rekrutierung.....	23
2.3 Selbstabnahme der Vaginallavage	24
2.4 Gynäkologischer Abstrich.....	25
2.5 Aufarbeitung von Vaginallavagen.....	26
2.6 Aufarbeitung von Abstrichen	26
2.7 HPV-Nachweis	27
2.7.1 PCR	27
2.7.2 HPV-Genotypisierung mittels Luminex-Technologie.....	29
2.8 Qualitätssicherung der Luminex-Technologie	30
2.9 APTIMA® HPV-Test.....	31
2.10 Datenerfassung und Auswertung	32
3 Ergebnisse	34
3.1 Probandinnen und Proben.....	34
3.2 Übereinstimmung der Ergebnisse: Lavage versus Zervixabstrich	35
3.2.1 Alle HPV-Typen	35
3.2.2 HR-HPV-Typen.....	36
3.2.3 HPV 16	37
3.2.4 LR-HPV-Typen.....	38
3.3 HPV-Prävalenz.....	39
3.3.1 HPV-Prävalenz	39

Inhaltsverzeichnis

3.3.2	HR-HPV-Prävalenz	40
3.3.3	Prävalenz von HPV 16.....	40
3.3.4	LR-HPV-Prävalenz.....	40
3.4	HPV-Genotypen Verteilung	41
3.4.1	HPV-Infektion und Alter	44
3.5	Rauchverhalten und Sexualpartneranzahl.....	46
3.5.1	Rauchverhalten.....	46
3.5.2	Anzahl der Sexualpartner	48
3.6	Korrelation von HPV-Nachweis mit zyto- und histologischen Befunden	49
3.6.1	Anteil der Probandinnen mit zytologischen bzw. histologischen Befunden	49
3.6.2	Zytologie/Histologie bei HPV-positiven Frauen.....	50
3.6.3	Zytologie bei HR-HPV-positiven Frauen	51
3.7	Qualitätssicherungen der Luminex-Technologie	51
3.7.1	Methodenäquivalenzversuch	51
3.7.2	Ringversuch.....	52
3.8	APTIMA® HPV-Test.....	52
4	Diskussion	54
4.1	Methodenvergleich: zervikovaginale Lavage versus Zervixabstrich	54
4.2	HPV-Prävalenz.....	57
4.2.1	Gesamte Studienpopulation.....	57
4.2.2	Studiensubgruppen.....	59
4.3	HPV-Typenverteilung	60
4.4	Rauchverhalten und Sexualpartneranzahl.....	62
4.5	Korrelation von HPV-Nachweis mit zyto- und histologischen Befunden	63
4.6	Qualitätssicherung der Luminex-Technologie	65
4.7	APTIMA® HPV-Test.....	65
5	Literaturverzeichnis	68
	Abkürzungsverzeichnis.....	76
	Tabellenverzeichnis.....	79
	Abbildungsverzeichnis.....	80
	Anhang.....	81
	Eidesstattliche Versicherung	97
	Lebenslauf.....	99
	Publikationsliste.....	100
	Danksagung	101

Zusammenfassung

Hintergrund: HPV-Infektionen sind wahrscheinlich mit die am häufigsten sexuell übertragenen Infektionen. Ca. 15 von über 120 bekannten HPV-Genotypen gehören zur High-Risk-Gruppe und sind für Entstehung fast aller Fälle des Zervixkarzinoms verantwortlich. Persistierende Infektion mit HPV-Typ 16 und 18 verursacht etwa 70% aller Zervixkarzinomerkrankungen. In Vorbereitung einer deutschlandweiten Erhebung der HPV-Prävalenz mittels Selbstabnahme-Sets bei Frauen zwischen 20 und 25 Jahren wurden HPV-Genotypisierungen von Bürstenabstrichen mit vaginalen Selbstspülungen verglichen.

Methoden: Eingeschlossen wurden Frauen im Alter von 20-30 Jahren mit einem Termin beim Gynäkologen zur Früherkennungsuntersuchung (Screening-Gruppe) oder in einer Dysplasiesprechstunde (Dysplasie-Gruppe). Vor dem Arzttermin wurden ein Selbstabnahme-Set zur vaginalen Spülung und ein Fragebogen zu demographischen Angaben, Sexualverhalten, Krankengeschichte und Akzeptanz des Selbstabnahme-Sets nach Hause zugeschickt. Beim Gynäkologen wurde ein Bürstenabstrich zur HPV-Analyse abgenommen. HPV-DNA aus beiden Proben wurde mittels GP5+/6+ PCR amplifiziert. Die HPV-Typisierung erfolgte mittels Luminex-Technologie mit Bestimmung von 18 high-risk und 8 low-risk HPV-Genotypen. Die Übereinstimmung der Ergebnisse wurde anhand der Interrater-Reliabilität κ überprüft. Eine gute Übereinstimmung wurde bei einem $\kappa \geq 0,6$ angenommen. Zusätzlich wurde die HPV-Prävalenz in der Studienpopulation berechnet.

Ergebnisse: Zwischen April 2009 und Januar 2010 wurden insgesamt 237 Frauen für die Studienteilnahme rekrutiert. Davon wurden 156 (65,8%) in die Studie eingeschlossen, 55 wurden der Dysplasie-Gruppe und 101 der Screening-Gruppe zugeteilt. Der Altersmedian der Teilnehmerinnen lag bei 25,6 Jahren.

Die Übereinstimmung der Testergebnisse aus Abstrich und Lavage für alle HPV-Typen lag bei $\kappa = 0.72$ für die gesamte Studienpopulation, bei $\kappa = 0.62$ in der Dysplasie-Gruppe und bei $\kappa = 0,71$ in der Screening-Gruppe. Die höchsten Kappa-Werte wurden

Zusammenfassung

für die Übereinstimmung der HPV 16 positiven Proben berechnet: 0,82 in der gesamten Studienpopulation, 0,84 in der Dysplasie-Gruppe und 0,78 in der Screening-Gruppe.

Es wurde folgende HPV-Prävalenz berechnet: HPV positiv: 52,6% (gesamte Studienpopulation) vs. 76,4% (Dysplasie-Gruppe) vs. 39,6% (Screening-Gruppe). High-risk-HPV positiv: 45,5% (gesamte Studienpopulation) vs. 70,9% (Dysplasie-Gruppe) vs. 37,1% (Screening-Gruppe). HPV 16 positiv: 26,3% (gesamte Studienpopulation) vs. 40% (Dysplasie-Gruppe) vs. 18,8% (Screening-Gruppe).

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse von HPV-Genotypisierungen aus selbstdurchgeführten vaginalen Spülungen und durch Gynäkologen abgenommene Abstriche sind vergleichbar. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit dem konventionellen Bürstenabstrich sprechen für den Einsatz der Methode und des Selbstabnahme-Sets in der Hauptstudie deutschlandweit.

Abstract

Background: HPV-infections are probably the most common sexually-transmitted infections. Approximately 15 of over 120 known HPV-genotypes are in a high-risk group and are responsible for the development of almost all cases of cervical cancers. Persistent infection with HPV-types 16 and 18 causes almost 70% of all cervical cancer cases. In preparation for a nationwide study of HPV prevalence using self-sampling devices by women between 20 and 25 years, HPV-genotyping by cervical smear sampling was compared to self-sampled vaginal lavage.

Methods: Women aged between 20 and 30 years with a gynaecology appointment for routine checkup (screening group) or for a dysplasia clinic (dysplasia group) were included. Before the doctor's appointment, a self-sampling kit was sent to each patient, along with a questionnaire on demographics, sexual behaviour, medical history, and device acceptance. During the gynaecology appointment a cervical smear was taken for HPV analysis. HPV-DNA from both samples was amplified by GP 5+/6+ PCR. HPV-typing was performed using Luminex technology with the ability to detect 18 high risk and 8 low risk HPV genotypes. The concordance between results was checked using Kappa statistics. A good concordance was accepted if $\kappa \geq 0.6$. Additionally, the HPV prevalence in the study population was calculated.

Results: Between April 2009 and January 2010 237 women were recruited for the study. Of these, 156 (65.8%) were included in the study, 55 in the dysplasia group and 101 in the screening group. The median age of participants was 25.6 years. The concordance of results from smear and lavage for all HPV types was $\kappa = 0.72$ for the whole study population, $\kappa = 0.62$ for the dysplasia group and $\kappa = 0.71$ for the screening group. The highest kappa values were calculated for the congruence of HPV 16 positive samples: 0.82 in the whole study population, 0.84 in the dysplasia group and 0.78 in the screening group.

The following HPV-prevalence was calculated: HPV positive: 52.6% (whole study population) vs. 76.4% (Dysplasia Group) vs. 39.6% (Screening Group). High-risk HPV positive: 45.5% (whole study population) vs. 70.9% (Dysplasia group) vs. 37.1%

Abstract

(Screening group). HPV-16 positive: 26.3% (whole study population) vs. 40% (Dysplasia group) vs. 18.8% (Screening group).

Conclusion: The results of HPV genotyping from self-sampled vaginal lavage and from smears taken by gynaecologists are comparable. The good agreement of the results with the conventional brush-smear supports the use of the method and self-sampling kits in the main study across Germany.

1 Einleitung

1.1. Papillomviren

1.1.1 Klassifikation

Seit 2002 werden die Papillomviren (PV) nicht mehr zur Familie Papovaviridae gezählt, sondern wurden im 7th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) der eigenen Familie Papillomaviridae zugeordnet (1).

Heutzutage sind über 189 Genotypen klassifiziert (2). Davon werden mindestens 120 Genotypen durch humane PV (HPV) präsentiert. Sie werden in fünf Gattungen unterteilt: Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- und Nu-HPV. HPV, die mit der Entstehung von Genitalwarzen und Karzinomen assoziiert sind, gehören zur Gattung Alpha und werden oft auch als genital-mukosale Typen bezeichnet. Je nach den Krankheitsbildern, die sie verursachen, werden genitale HPV in zwei Gruppen eingeteilt: Low-Risk (LR) und High-Risk (HR) HPV. LR-HPV verursachen benigne genitale Warzen, auch Condylomata acuminata genannt. HR-HPV führen zur Entstehung von Dysplasien und Karzinomen im Anogenitaltrakt und Oropharyngealraum. In Tabelle 1 sind HR- und LR-HPV zusammengefasst. Demnach gehören 15 HPV-Typen zur HR-Gruppe und 11 zur LR-Gruppe. Bei drei Typen ist der HR-Status wahrscheinlich, aber nicht gesichert.

Tab. 1: Klassifikation von genital-mukosalen HPV (3).

HPV	
HR	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
LR	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
HR-Status möglich	26, 53, 66

1.1.2 Molekularbiologie von HPV

HPV sind unbehüllte ikosaedrische Viren mit einem Durchmesser von ca. 55 nm (Abb. 1). Die zirkuläre Doppelstrang-DNA ist von einem Kapsid aus 72 Kapsomeren umhüllt

und enthält etwa 8000 Basenpaare (bp). Das Kapsid besteht aus zwei Strukturproteinen: dem major capsid protein (L1), welches 80% des Gesamtproteins des Virus ausmacht, und dem minor capsid protein (L2).

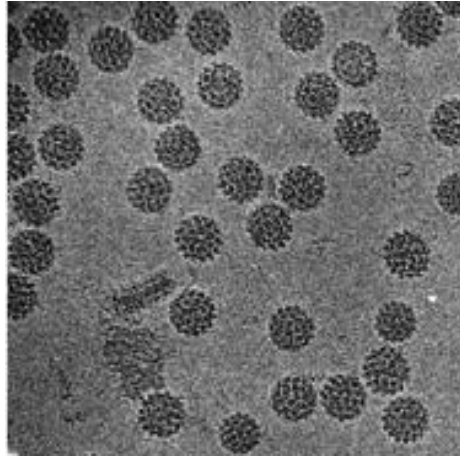


Abb. 1: Elektronmikroskopisches Bild von PV (4).

Die Besonderheit der HPV-DNA besteht darin, dass nur ein Strang als Vorlage für die Transkription dient – alle viralen Gene sind auf diesem Strang lokalisiert. Auf dem kodierenden Strang unterscheidet man zwei Regionen:

- Eine frühe, „Early-Region“ mit sieben offenen Leserahmen – „open reading frames“ (ORF). Diese Region kodiert für die viralen Onkoproteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7 (Abb. 2). Die viralen Onkoproteine übernehmen vielfältige Aufgaben, welche für die Reproduktion der Viren wichtig sind.
- Eine späte, „Late-Region“ mit zwei ORF kodiert für die viralen Strukturproteine L1 und L2. Diese Region wird aktiv, sobald HPV-infizierte Zellen den Bereich der differenzierten Keratinozyten des Epithels (Stratum spinosum, Stratum granulosum) erreichen und sorgt für die Synthese von Strukturproteinen L1 und L2, welche für die Kapsidbildung benötigt werden.

Auf dem nichtkodierenden Strang befindet sich eine etwa 1000 bp lange Region auch „long control region“ (LCR) genannt. Sie enthält Kontrollelemente für die Transkription und Replikation.

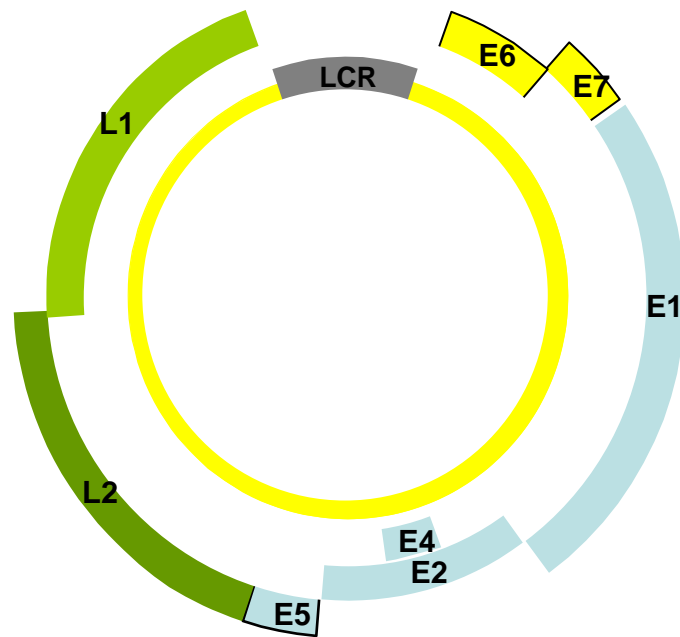


Abb. 2: Struktur des HPV-Genoms am Beispiel von HPV 16 (modifiziert nach 4). E1, E2, E4, E5, E6 und E7 – virale Onkoproteine; L1 und L2 – virale Strukturproteine; LCR – long control region.

1.1.3 Infektion und Krankheitsbilder

Die Infektionen mit humanen Papillomviren gehören zu den häufigsten sexuell übertragbaren viralen Erkrankungen (5). HPV induzieren beim Menschen eine Vielzahl von Krankheitsbildern. Dazu zählen benigne und maligne Tumore im Anogenitaltrakt, im Respirationstrakt und an der Haut.

HPV sind für 5.2% der Krebsfälle weltweit verantwortlich und gehören somit zu den wichtigsten biologischen Karzinogenen (6). Die Assoziation mit HPV ist bei verschiedenen Krankheitsbildern unterschiedlich hoch. In Abbildung 3 sind Krebserkrankungen weltweit im Jahr 2002 jeweils mit auf HPV zurückzuführendem Anteil dargestellt.

Einleitung

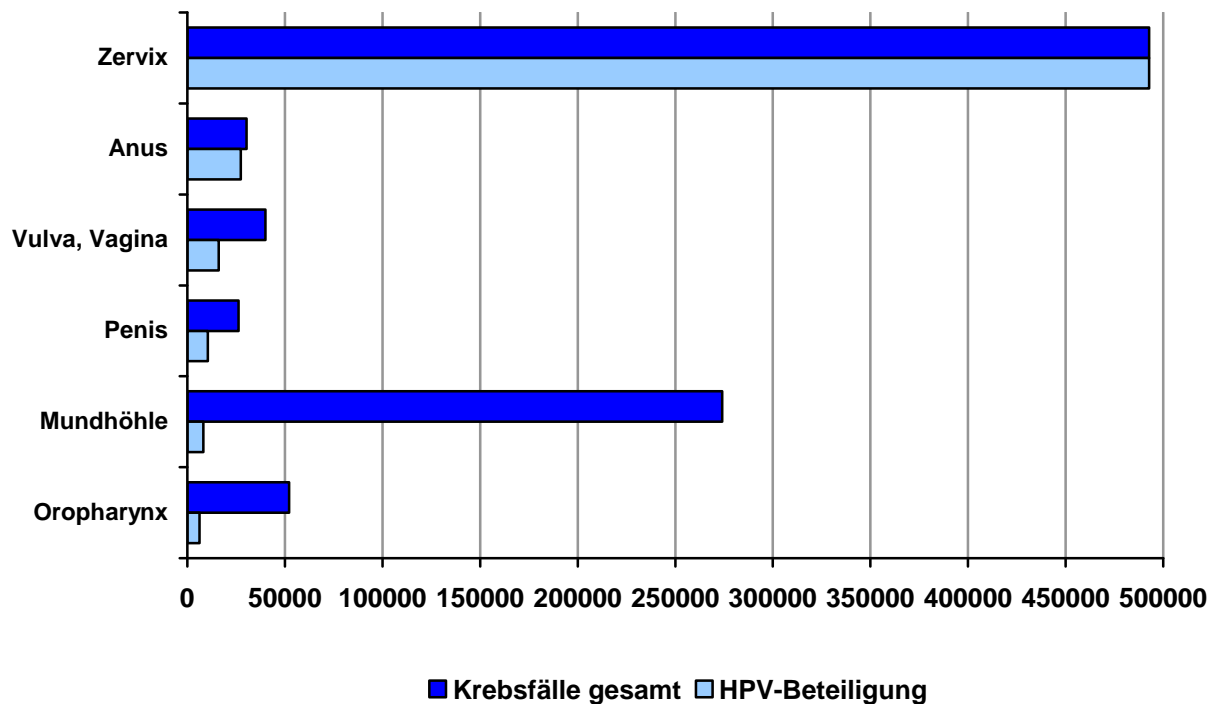


Abb. 3: HPV-Beteiligung bei der Karzinogenese weltweit im Jahr 2002 (6).

Was das Zervixkarzinom angeht, so ist es allgemein akzeptiert, dass für die Entstehung eine Infektion mit HPV vorliegen muss. Nahezu alle (99,7%) Zervixkarzinome sind HPV-assoziiert (7). Dabei besitzt HPV 16 die stärksten onkogenen Eigenschaften, gefolgt von HPV 18. Diese beiden Genotypen zusammen sind für über 70% der Zervixkarzinome weltweit verantwortlich (3).

Die Erkrankung mit der zweithöchsten Beteiligung der HPV bilden Analkarzinome: hierbei sind etwa 90% der Tumore durch HPV hervorgerufen (8). Bei anderen Karzinomen des Genitaltrakts ist die Korrelation niedriger. So sind 60-65% der Vaginalkarzinome und 20-50% der Vulvakarzinome HPV-bedingt (9; 10). Dazu muss man sagen, dass nur verruköse und basaloide Vulvakarzinome auf HPV zurückzuführen sind. Sie werden vor allem bei prämenopausalen Patientinnen diagnostiziert und sind meistens mit einer vulvären intraepithelialen Neoplasie (VIN) als Vorläufererkrankung assoziiert (11). Die HPV-Beteiligung an Peniskarzinomentstehung liegt laut unterschiedlichen Studien zwischen 30 und 50% (12; 13; 14). Weniger stark mit HPV assoziiert sind die Karzinome im Kopf- und Halsbereich. Bei dieser Gruppe sind Alkoholkonsum und Nikotinabusus nach wie vor die Hauptrisikofaktoren. Eine große Studie mit 1600 Fällen und 1700 Kontrollen zeigte, dass etwa 5% der

Mundhöhlenkarzinome und etwa 15% der Karzinome im Oropharyngealraum HPV-bedingt sind (15).

1.2 Zervixkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das Zervixkarzinom ist die zweithäufigste Krebsart bei Frauen weltweit (6). 2002 gab es schätzungsweise 493,000 neue Fälle und 274,000 Sterbefälle. 83% der Fälle wurden in Entwicklungsländern ohne Krebsfrüherkennungsprogramme registriert.

Die höchste Inzidenzrate wird in Ost- und Südafrika, Melanesien, der Karibik und Zentralamerika beobachtet. In den entwickelten Ländern ist die Inzidenz deutlich niedriger, wobei vor der Einführung der Krebsfrüherkennungsprogramme in den 60er und 70er Jahren in Europa, Nordamerika, Australien und Neuseeland ähnliche Werte wie in Entwicklungsländern beobachtet wurden (16).

Situation in Deutschland und Europa: Berichten des Robert Koch-Instituts (RKI) zufolge lag die geschätzte Neuerkrankungsrate in Deutschland im Jahr 2008 bei 11,6 Fällen pro 100.000 Frauen und damit höher als der Durchschnittswert für Europa (11 Fälle pro 100.000 Frauen). Höhere Erkrankungsraten als in Deutschland werden vor allem in Osteuropa, Dänemark und Belgien beobachtet. Finnland hat nach wie vor die niedrigsten Inzidenz- und Mortalitätsraten (17).

In Abbildung 4 ist zu sehen, dass die höchste Erkrankungsrate in Deutschland im Jahr 2006 zwischen dem 40. und 59. Lebensjahr lag. Somit ist der größte Anteil der Patientinnengruppe heutzutage deutlich jünger als noch 1980. Das mittlere Erkrankungsalter am „in situ Karzinom“ beträgt 36 Jahre, am invasiven Karzinom 52 Jahre.

Einleitung

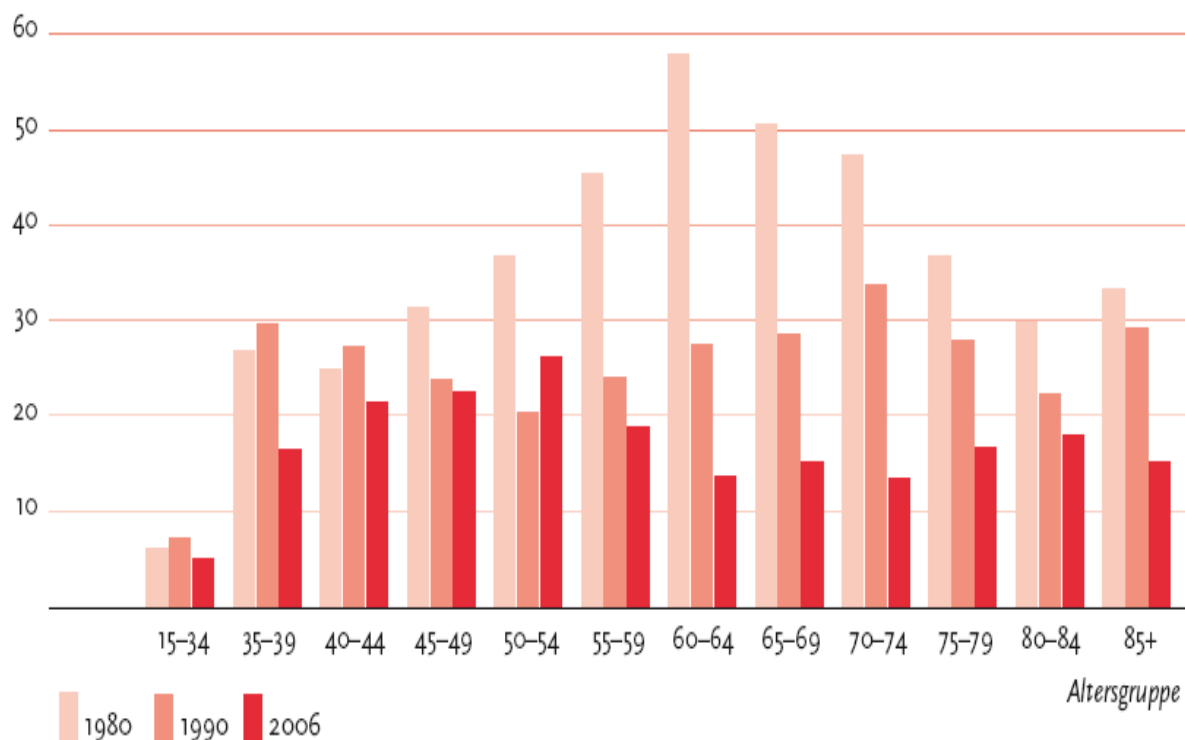


Abb. 4: Altersspezifische Erkrankungsraten in Deutschland für 1980, 1990 und 2006, Fälle pro 100.000 Frauen (18).

Seit 1970 gehört die jährliche Untersuchung des Zervixabstrichs auf Vorliegen von zytologischen Anomalien (Pap-Abstrich) bei Frauen ab 20 Jahren zum Angebot der gesetzlichen Krebsfrüherkennung. Seit der Einführung dieses Screeningverfahrens ist eine stetige Abnahme der Zervixkarzinominzidenz und Mortalität zu beobachten. Die Abnahme der Inzidenz war bis Anfang der 90er-Jahre am stärksten. In den letzten Jahren sind die Inzidenzraten in Deutschland annähernd konstant geblieben. Die Sterberate am Zervixkarzinom sinkt dagegen weiter ab (17). Die 5-Jahres-Überlebensrate beim Vorliegen eines invasiven Karzinoms liegt in Deutschland bei 68% (17).

1.2.2 Entstehung des Zervixkarzinoms

Die meisten bösartigen Veränderungen der Zervix treten in der so genannten Transformationszone auf. Hierbei handelt sich um eine Grenzzone zwischen dem Zylinderepithel der Endozervix und dem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel der Ektozervix. Vor der Pubertät liegt die Zone tief im Zervikalkanal. Bei geschlechtsreifen Frauen verlagert sie sich hormonbedingt auf die Oberfläche der Portio (Ektopie). Bei postmenopausalen Frauen liegt sie wieder im Zervikalkanal.

Entsprechend ihrer Lokalisation entsteht das Zervixkarzinom bei prämenopausalen Frauen meistens auf der Portiooberfläche und bei postmenopausalen Frauen im Zervikalkanal (19).

85% der Zervixkarzinome sind Plattenepithelkarzinome, bei 10-15% handelt es sich um Adenokarzinome oder Mischkarzinome. Sehr selten sind neuroendokrine Zervixkarzinome. Etwa 50% der Plattenepithelkarzinome werden durch HPV 16 verursacht (3). Bei den weniger häufigen Karzinomformen ist HPV 18 der prädominierende Genotyp: 56% der Adenokarzinome und 39% der neuroendokrinen Zervixkarzinome werden hierdurch verursacht (20).

Das Risiko für Frauen sich zumindest einmal im Leben mit HPV zu infizieren beträgt mindestens 75% (5). Damit es zu einer Infektion kommen kann, muss HPV die Zellen der Basalschicht des Epithels erreichen. Mikrotraumen begünstigen möglicherweise die Durchdringung des Virus bis zu dieser Schicht. Basalzellen sind langlebig und verfügen über Stammzeleigenschaften. Das virale Genom verweilt in Episomform in den Basalzellen. Die Replikation findet erst in den oberen Zellschichten statt. Die infizierten Zellen sind an der veränderten Morphologie zu erkennen und werden als Koilozyten bezeichnet. Die fertigen Virione werden mit den obersten absterbenden Epithelzellen passiv freigesetzt (21).

Die meisten Infektionen sind harmlos und bilden sich spontan zurück (22). Doch 20% der Infektionen persistieren und 3-5% entwickeln sich zu einem Zervixkarzinom (23). Es gibt keine einheitlichen zeitlichen Angaben ab wann eine HPV-Infektion als persistent zu bezeichnen ist. Einigen Studien zufolge liegt eine Persistenz vor, wenn derselbe HPV-Typ in zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen im Abstand von 4-6 Monaten diagnostiziert wird (5). Von der Primärinfektion bis zur Entwicklung eines invasiven Karzinoms vergehen normalerweise mindestens zehn Jahre, häufig mehr (24).

In Abbildung 5 ist die Entwicklung einer HPV-Infektion von einer gutartigen kondylomatösen Läsion zum invasiven Zervixkarzinom schematisch dargestellt. Dabei ist anzumerken, dass die Infektion nicht obligat alle gezeigten Stadien durchlaufen muss. So kann sich die Infektion gleich als mäßige oder schwere Dysplasie bemerkbar machen. Bis zum Stadium carcinoma in situ (CIS) vergehen in der Regel mehrere Jahre (21).

Einleitung

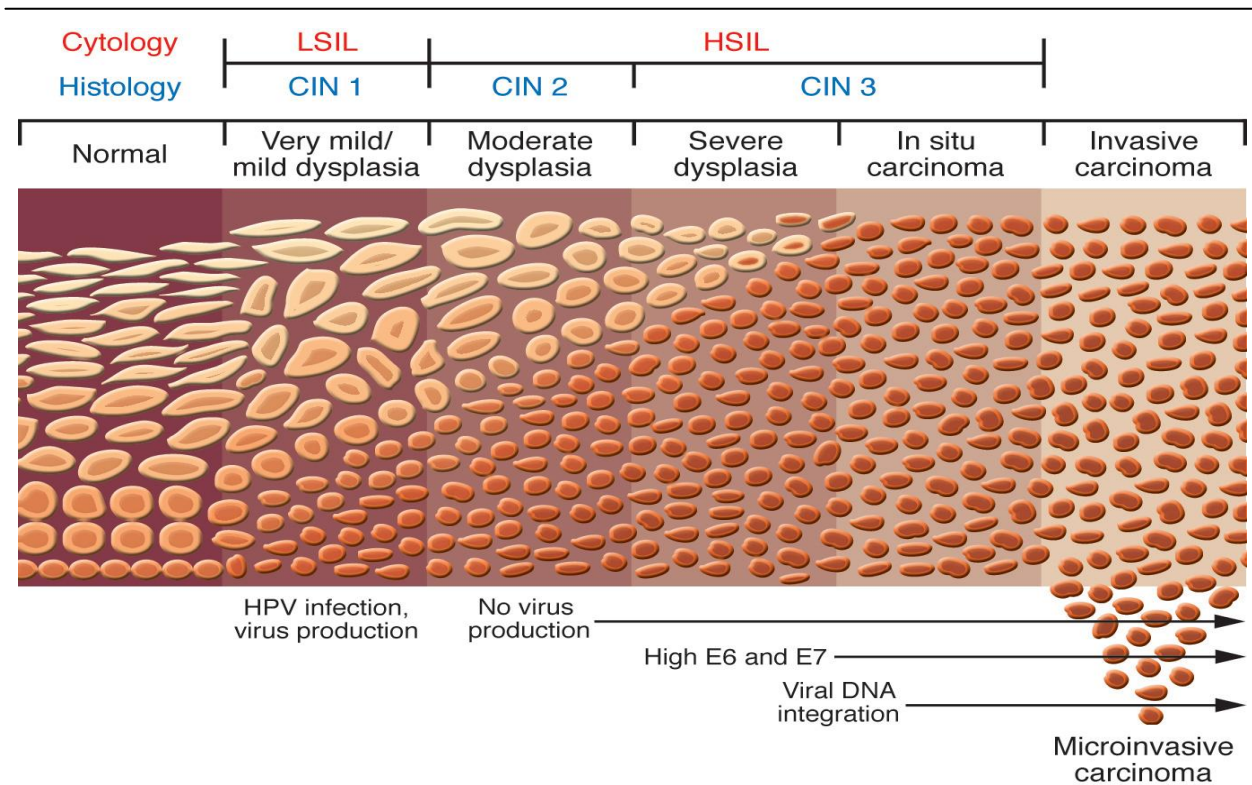


Abb. 5: Entwicklung der HPV-Infektion. LSIL – low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL – high-grade squamous intraepithelial lesion; CIN – cervical intraepithelial neoplasia; E6 und E7 – virale Onkoproteine (aus 6).

Die Zervixdysplasien (cervical intraepithelial neoplasia – CIN) werden je nach Schweregrad der Zellveränderungen des unverhornten Plattenepithels in drei Gruppen eingeteilt:

- CIN I: leichte Dysplasie. Basalzellen sind mehrschichtig angeordnet, geringe Mitosenzahl.
- CIN II: mäßige Dysplasie. Deutliche Verbreiterung der Basalschicht, vermehrt Zell- und Kernatypien, hohe Mitosenzahl.
- CIN III: schwere Dysplasie. Atypien in allen Schichten des Epithels, die Schichtung ist noch erkennbar.
- CIS: Carcinoma in situ. Die Epithelschichtung ist aufgehoben, gesamtes Epithel atypisch verändert.

1.2.3 Nomenklatur

Es gibt verschiedene Klassifikationen für die Beurteilung der Schwere einer Dysplasie. Im angloamerikanischen Raum hat sich die Bethesda Klassifikation behauptet. Die Atypien werden in zwei Gruppen eingeteilt: low-grade squamous intraepithelial lesions

(LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). Dabei entspricht der zytologische Befund LSIL der leichten Dysplasie (CIN I) und HSIL-Zytologie den beiden schwereren Formen CIN II und CIN III. Die zweideutigen Befunde werden als ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance) oder ASC-H (Atypical squamous cell – cannot exclude HSIL) bezeichnet (25).

In Deutschland werden die zytologischen Zervixabstriche nach der Münchener Nomenklatur II beurteilt. Diese beruht auf der von Papanicolaou und Traut entwickelten Methode. Die beiden Wissenschaftler haben die Zervixabstriche für die Beurteilung mit der speziellen, selbstentwickelten und später verbesserten Lösung gefärbt (26). Laut der Münchener Nomenklatur II werden die Befunde in fünf Gruppen Pap I bis Pap V eingeteilt.

In Tabelle 2 sind die beiden Nomenklaturen gegenübergestellt und mit dem empfohlenen Prozedere bezogen auf München II ergänzt.

Tab. 2: Münchener Nomenklatur II und Bethesda Klassifikation (modifiziert nach 27).

Zytologischer Befund (in Anlehnung an München II)	München II	Bethesda	Prozedere (in Anlehnung an München II)
Normales Zellbild	I	negativ	Kontrolle in einem Jahr
leichte entzündliche, degenerative oder metaplastische Veränderungen	II	negativ	Eventuell zytologische Kontrolle
unklarer Befund: schwere entzündliche oder degenerative Veränderungen, auffällige Drüsenzellen; eine Dysplasie, ein Carcinoma in situ oder (in seltenen Fällen) ein Malignom können nicht ausgeschlossen werden	III	ASC-US¹ ASC-H²	Je nach klinischem Befund kurzfristige zytologische Kontrolle oder histologische Abklärung
Zeichen einer leichten Dysplasie (CIN I)³	III_d	Low-grade SIL⁴	Kolposkopisch-zytologische Kontrolle in drei Monaten
Zeichen einer mäßigen Dysplasie (CIN II)	III_d	High-grade SIL	
Zeichen einer schweren Dysplasie (CIN III) / Carcinoma in situ (Cis)	IV_a		Kolposkopisch-zytologische Kontrolle und histologische Klärung
Zeichen einer schweren Dysplasie (CIN III) / Carcinoma in situ (Cis) . Zellen eines invasiven Karzinoms nicht auszuschließen	IV_b		
invasives Karzinom	V	Karzinom	

1) **ASC-US**: atypical squamous cells of undetermined significance.

2) **ASC-H**: Atypical squamous cells - cannot exclude HSIL.

3) **CIN**: cervical intraepithelial neoplasia.

4) **SIL**: squamous intraepithelial lesions.

Die Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms erfolgt nach FIGO-Staging (klinisch) und nach TNM-Klassifikation (chirurgisch). Zwischen dem klinischen Staging und der tatsächlichen intraoperativen Tumorausbreitung können erhebliche Unterschiede bestehen. Die Grundlage des klinischen FIGO-Stagings ist der Tastbefund bei der vaginalen und rektalen Untersuchung, Spekulumuntersuchung, Kolposkopie, Zervixbiopsie, Nierenultraschall, Zysto- und Rektoskopie sowie Thoraxröntgen. Die Qualität des Befundes hängt sehr von der Erfahrung des Untersuchers ab.

1.2.4 Primäre Prävention: HPV-Impfung

Seit Ende 2006 ist die HPV-Impfung von der European Medicines Agency zugelassen und seit März 2006 in Deutschland von der Ständigen Impfkommission am Robert Koch-Institut empfohlen. Seit Mitte 2007 bieten die gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland für alle Mädchen im Alter von 12 bis 17 Jahren eine Impfung gegen HPV an. Einige gesetzliche Krankenkassen übernehmen die Kosten für die Impfung bis zum vollendeten 26. Lebensjahr.

Eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Impfung gegen HPV spielte die Entdeckung der Fähigkeit des Hauptstrukturproteins L1 sich nach rekombinanter Expression spontan zu virusähnlichen Partikeln (virus-like particle – VLP) zusammenzulagern (28). VLPs sind leere Virushüllen (Kapside), welche in der Lage sind hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern zu induzieren, da sie den echten Virionen morphologisch und immunologisch sehr ähneln. Die induzierten Antikörper sind HPV-typspezifisch.

In Deutschland sind zwei Impfstoffe verfügbar: der bivalente Impfstoff Cervarix des Pharmaunternehmens GlaxoSmithKline (GSK) und der quadrivalente Impfstoff mit dem Handelsnamen Gardasil der Firma Merck. Cervarix enthält VLPs der HR-HPV 16 und 18 und verhindert damit die Entstehung von mindestens 70% der Zervixkarzinome. Gardasil enthält zusätzlich VLPs von LR-HPV 6 und 11 und schützt damit auch gegen 90% der Genitalwarzen. Beide Impfstoffe werden im Zeitraum von 6 Monaten insgesamt drei Mal intramuskulär verabreicht.

Die Wirksamkeit der beiden Impfstoffe wurde in randomisierten, doppelblinden, plazebokontrollierten, klinischen Studien geprüft. Die Studie FUTURE II untersuchte die Wirksamkeit und Sicherheit von Gardasil (29). Die Effektivität und kreuzprotektive Eigenschaft von Cervarix wurde in der Phase III Studie PATRICIA erforscht (30; 31). Ergebnisse der Studien sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Ergebnisse der Studien FUTURE II und PATRICIA bezüglich der Wirksamkeit der Impfstoffe Gardasil und Cervarix.

Wirksamkeit gegen CIN ¹ II, CIN III, Cis ² :	FUTURE II (Gardasil)	PATRICIA (Cervarix)
Unabhängig vom HPV-Typ bei HPV-naiven Frauen ³	46%	80%
Assoziiert mit HPV 16 und 18 bei HPV 16 und/oder HPV 18 negativen Frauen	97-100%	98,9%

1) **CIN**: cervical intraepithelial neoplasia.

2) **Cis**: Carcinoma in situ.

3) Frauen die vor der Impfung HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 und 59 (FUTURE I/II) bzw. HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68 (PATRICIA) negativ waren.

Bei Cervarix wurde zusätzlich eine Kreuzprotektion gegen HPV 45, welches nah mit HPV 18 verwandt ist, gegen HPV 31 und 33, welche eine ähnliche Struktur wie HPV 16 aufweisen, und gegen HPV 51 nachgewiesen (31). Dies ist von großer Bedeutung, denn HPV 16 und 18 und diese vier Genotypen sind für 83% der Zervixkarzinomfälle weltweit verantwortlich (32).

1.2.5 Sekundäre Prävention

Im Rahmen der sekundären Prävention wird die bereits erwähnte jährliche Untersuchung des Zervixabstrichs auf Vorliegen von zytologischen Atypien bei Frauen ab 20 Jahren (Pap-Abstrich) durchgeführt. Dabei wird Zellmaterial mittels eines Wattestäbchens, Spatels oder einer Bürste von der Portio und dem Zervikalkanal der Patientin entnommen, auf einem Objektträger ausgestrichen und fixiert. Nach anschließender Färbung der Probe können Kerngröße, Morphologie und Struktur des Chromatins der Zellen mikroskopisch begutachtet und klassifiziert werden (33). Etwa 50% der Frauen in Deutschland nehmen dieses Angebot zur Krebsfrüherkennung wahr (34). Diese relativ niedrige Zahl ist dem Konzept des Früherkennungsprogramms zuzuschreiben. In Deutschland wird das opportunistische Screening durchgeführt, die Teilnahme erfolgt auf eigenen Wunsch der Frauen und wird nicht durch das

Gesundheitssystem überwacht. Eine Erhöhung der Teilnahmerate wäre durch das Einführen des organisierten Screeningprogramms zu erwarten.

Kolposkopie gehört auch zu den präventiven Maßnahmen und wird bei bestimmter Indikation eingesetzt. Bei unklaren (Pap III) oder pathologischen (Pap IIIc und höher) zytologischen Befunden ist es den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGGG) zufolge sinnvoll, eine Kolposkopie durchzuführen (35).

Der konventionelle Pap-Test besitzt zwar eine hohe Spezifität ist aber durch eine geringe Sensitivität diagnostisch limitiert. Zur Abklärung von abnormen Pap-Tests oder bei kolposkopischen Auffälligkeiten kann aufgrund seiner hohen Sensitivität ein HPV-Nachweis durchgeführt werden. Der Nachweis der An- oder Abwesenheit von HR-HPV-Typen (insbesondere HPV 16 und 18) hilft das Risiko der Patientin für Krebsvorstufen oder Krebs abzuschätzen. Es ist bewiesen, dass HR-HPV-negative Frauen ein um 30-50% niedrigeres 5-Jahres-Risiko haben eine CIN II zu entwickeln als Frauen ohne Auffälligkeiten im Pap-Test (36; 37).

Je nach Testverfahren werden HPV-DNA, -RNA oder -Proteine nachgewiesen. HPV-DNA wird am Häufigsten mit Hybrid Capture II (HC2) oder mit Hilfe von PCR nachgewiesen. Der APTIMA® HPV-Test und der PreTect HPV-Proofer weisen die viralen mRNA Transkripte nach.

Die hohe Sensitivität von DNA- und RNA-Tests zeigten Szarewski et al. in einer Studie zum Vergleich verschiedener Testverfahren bei Frauen mit abnormen Pap-Tests. Zu den vier Zusatztests, die bei CIN II und CIN III eine Sensitivität > 95% zeigten, gehörten die drei DNA-Tests AMPLICOR® (98.9% und 99.5%), Hybrid Capture II (99.6% und 99.5%), Line Array (98.2% und 99%) und der RNA-Test APTIMA (95.2% und 97.4%). Die DNA-Tests waren jedoch weniger spezifisch als der RNA-Nachweis (38). Auch die Studie von Monsonigo et al. zeigt sowohl bei CIN I (AMPLICOR-Test: 89.2% vs. Pap-Test: 19.4%-55%) als auch bei CIN II/III (95.2% vs. 40.3%-72.6%) eine deutlich höhere Sensitivität zugunsten des DNA-Tests. Die Zytologie ist jedoch mit bis zu 99.5% bei CIN II/III wesentlich spezifischer als der DNA-Test (42.4%) (39). Die diagnostische Limitation des HPV-Nachweises liegt also darin, dass eine hohe Anzahl von Infektionen nachgewiesen wird, die sich nicht zu schwerwiegenden Neoplasien entwickeln.

1.2.6 Therapie

Die Rückbildungsrate der leichten und mittelgradigen zervikalen Dysplasien ist bei Frauen unter 30 Jahren hoch. 80% der CIN I und 40% der CIN II bilden sich spontan zurück. Nach den Leitlinien der DGGG sollte in diesen Fällen ein konservatives Management bevorzugt werden. Dies beinhaltet zytologisch-histologische Kontrollen alle 6 Monate. Der operative Eingriff ist bei über zwei Jahre persistierender CIN I und bei über einem Jahr persistierender CIN II indiziert. CIN III muss immer operativ behandelt werden. Dabei wird eine Konisation durchgeführt mit dem Ziel der vollständigen Entfernung der Transformationszone mit allen neoplastischen Läsionen. Den Empfehlungen der DGGG zufolge ist die Konisation mittels Hochfrequenz-Schlinge (LEEP: Loop electrical excision procedure) die chirurgische Methode der Wahl (35). Die früher breit angewendete Messerkonisation weist die höchste Rate an Früh- und Spätkomplikationen auf und soll vor allem bei jungen Frauen mit Kinderwunsch nicht eingesetzt werden (40). Bei endozervikal lokalisierter CIN muss ein tiefer Konus reseziert werden. Dafür ist eine kolposkopisch gesteuerte Laserkonisation, eine Hochfrequenz-Nadelkonisation, die Schlingenkonisation mit Entnahme eines ekto- und endozervikalen Exzidates oder eine Messerkonisation geeignet.

Beim invasiven Karzinom kommen je nach klinischer Einteilung unterschiedliche operative, chemo- und radiotherapeutische Verfahren zum Einsatz.

1.3 HPV-Prävalenz und Alter

Weltweit ist die HPV-Prävalenz bei jüngeren Frauen (<30 Jahren) höher als bei älteren (41). Sie sinkt etwa nach dem 30. Lebensjahr und steigt im Alter >50 Jahren wieder an. Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in einigen europäischen Studien wieder. Die Frauen zwischen 20 und 30 Jahren bilden die Gruppe mit der höchsten HR-HPV-Prävalenz (27%) in Großbritannien (42). In Belgien sind 29% der 20 bis 24-jährigen Frauen HR-HPV positiv (43).

Im November 2010 wurde im Journal of Medical Virology die Studie zur HPV-Prävalenz bei deutschen Frauen im Alter zwischen 10 und 30 Jahren veröffentlicht (44). Das ist momentan die einzige Studie, die den aktuellen Stand zur HPV-Prävalenz bei jungen Frauen in ganz Deutschland präsentiert. Zwar gab es in den vergangenen Jahren Untersuchungen zur HPV-Prävalenz in einigen Bundesländern, die Ergebnisse lassen

sich jedoch aus verschiedenen Gründen nicht auf ganz Deutschland übertragen. Außerdem wurden die Frauen im Alter unter 30 Jahren entweder gar nicht erfasst, wie bei Petry et al., oder es wurden Frauen aller Altersgruppen untersucht (45; 46; 47). Lediglich in der Studie des RKI zu HPV-Prävalenz bei Berliner Frauen wurden jüngere Frauen im Alter zwischen 20 und 40 Jahren untersucht (48).

In der Tabelle 4 sind die Charakteristika der Studien zur HPV-Prävalenz in Deutschland dargestellt. Wie man sieht bestehen zwischen den einzelnen Studien erhebliche Unterschiede in der erhobenen Prävalenz, was auf viele verschiedene Faktoren zurückzuführen ist. So wurde z.B. der HPV-Nachweis mittels unterschiedlicher Methoden durchgeführt. Auch die Probenentnahme erfolgte nicht auf die gleiche Art und Weise. Große Unterschiede bestehen auch im Alter der Probandinnen. In der Studie von Petry et al. wurden die Frauen mit der höchsten HPV-Prävalenz (<30 Jahren) nicht untersucht. Damit erklärt sich der niedrige HPV-Prävalenzwert von 6,4%. Der hohe Wert von Speich et al. ist auch nicht repräsentativ, da bei 41% der in die Studie eingeschlossenen Patientinnen bereits in der Dünnschichtzytologie der Verdacht auf Dysplasie geäußert wurde. In den Studien mit höheren Prävalenzen wurden sowohl HR- als auch LR-HPV bestimmt. Bei Petry et al. und Schneider et al. wurden die Proben dagegen nur auf Vorliegen der HR-HPV untersucht.

Einleitung

Tab. 4: Charakteristika der Studien zur HPV-Prävalenz in Deutschland.

Studie, Jahr	Iftner et al., 2010 (44)	Speich et al., 2004 (46)	Petry et al., 2003 (45)	Schneider et al., 2000 (47)	Koch et al., 1997 (48)
Bundesland	Alle	Nordrhein- Westfalen	Niedersachsen/ Baden- Württemberg	Thüringen	Berlin
Zeitraum	02.2007-08.2008	-	12.1998-12.2000	01.1996-10.1998	09.1995-05.1996
Ausschluss- Kriterien	Hysterektomie; Alter > 30 Jahren	-	Hysterektomie; Schwangerschaft; CIN; Behandlung von CIN im vergangenen Jahr	Hysterektomie; Konisation; Schwangerschaft; CIN; atypischer Pap im vergangenen Jahr	Symptomatische Genitalinfektion
Teilnehmer- zahl	1692	2916 ¹	8466	5455	5022
Alter (mittleres Alter)	10-30 (21,5)	17-83 (40,5)	>30 (42,7)	18-70 (35)	20-40 (29,9)
HPV	HR+LR	HR+LR	HR	HR	HR+LR
Nachweis- methode	HC2; PapilloCheck; SPF10	PCR	HC2	PCR	PCR
Proben- entnahme	Bürste	.2	Baumwolltupfer	Bürste	Baumwolltupfer
Prävalenz (%)	22,3	32,5 ³	6,4	7,9	19,7
Häufigste HR-HPV- Typen	PapilloCheck: 16,51,56,31 SPF10: 16,51,31,52	16,31,18,58,51	-	-	16,31,33,39,18,35

1) Davon 1720 (59%) ohne Dysplasiezeichen und 1196 (41%) mit Verdacht auf Dysplasie.

2) HPV-Bestimmung erfolgte aus Proben mit bereits durchgeführter Dünnschichtzytologie.

3) Hohe Prävalenz aufgrund des hohen Anteils der Proben mit Dysplasieverdacht, deswegen nicht repräsentativ.

Schneider und Iftner haben den Zusammenhang zwischen der HPV-Prävalenz und dem Alter untersucht. Die höchste Prävalenz (14%) wurde bei Schneider et al. bei Frauen zwischen 18 und 25 Jahren gemessen. Bei Iftner und Mitarbeitern lag die höchste Prävalenz bei 20- bis 22-jährigen Frauen und betrug 28,3%.

Seit über sechs Jahren bieten die gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland für Mädchen im Alter von 12 bis 17 Jahren eine HPV-Schutzimpfung an, die die Verhinderung der Infektion durch die HR-HPV 16 und 18 und bei einem Impfstoff auch durch die LR-HPV 6 und 11 umfasst. Es ist nicht klar welche Auswirkung die Impfung auf die HPV-Prävalenz in der Zukunft haben wird. Daher sollte die HPV Prävalenz der Impfstoff- und nicht-Impfstoff Typen im Zeitverlauf untersucht werden. Deswegen ist es wichtig, über den aktuellen Stand bezüglich der HPV-Prävalenz bei jungen Frauen deutschlandweit informiert zu sein, um die Effekte der Impfung in der Zukunft interpretieren zu können.

Aus diesem Grund wurde 2009 in Zusammenarbeit des Robert Koch-Instituts (RKI) mit der Klinik für Gynäkologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin die Studie zur deutschlandweiten HPV-Prävalenzmessung bei jungen Frauen initiiert.

1.4 Studienkonzept

In der Hauptstudie mit repräsentativ ausgewählten Teilnehmerinnen (gestartet im Oktober 2010) wurden die selbstentnommenen zervikovaginalen Spülungen auf HPV untersucht und demografische Daten der Probandinnen sowie Sexualverhalten, Krankengeschichte und Akzeptanz des Selbstabnahme-Sets mittels Fragebogen erfragt.

Die Grundlage der aktuellen Arbeit bildet die vor Beginn der Hauptstudie durchgeführte Voruntersuchung. Im Rahmen dieser sollte nachgewiesen werden, dass die Ergebnisse des HPV-Nachweises aus den selbstentnommenen zervikovaginalen Lavagen mit denen aus der konventionellen Methode hinreichend gut übereinstimmen. Zur konventionellen Methode der Probenentnahme für die HPV-Bestimmung zählt der zervikale Bürstenabstrich beim Gynäkologen. Für die Durchführung der Vaginalspülung wurde durch die Firma Delphi Bioscience B.V. (ehemalige Pantarhei Devices B.V.) ein Selbstabnahme-Applikator (Screener) bereitgestellt.

Rekrutierungsziel der Studie waren 150 Probandinnen. Davon sollten 100 aus der „Screening-Gruppe“ sein, das heißt Patientinnen, die zum Gynäkologen zur Vorsorge kommen und bei denen aktuell keine Auffälligkeiten im Pap-Abstrich bekannt sind. Hier wurde eine niedrige normale HPV Prävalenz erwartet. Weitere 50 Probandinnen sollten die „Dysplasie-Gruppe“ bilden, das heißt Frauen, die wegen bekannter Auffälligkeiten im Pap-Abstrich zur Dysplasiesprechstunde überwiesen wurden. Hier wurde eine hohe HPV-Prävalenz erwartet. Diese Gruppen wurden definiert, um realistische Screening-Bedingungen abzubilden und gleichzeitig ausreichend HPV-Positive für den Vergleich der beiden Abnahmemethoden zu gewährleisten.

Des Weiteren sollte durch die Voruntersuchung folgendes ermittelt werden (bildet die Grundlage einer weiteren Doktorarbeit):

- Akzeptanz des Selbstabnahmegeräts
- Akzeptanz des Fragebogens
- Gründe für Teilnahmeverweigerung

1.5 Ziele und Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wird in den mit unterschiedlichen Methoden gewonnenen Proben die HPV-Genotypisierung mittels einer innovativen Luminex-basierten Technologie durchgeführt. Hierbei wird die Frage beantwortet, in wie weit die Ergebnisse des durch den Gynäkologen durchgeführten zervikalen Bürstenabstrichs mit denen der selbstentnommenen vaginalen Lavage übereinstimmen. Die Übereinstimmung der Ergebnisse wird mit Hilfe der Interrater-Reliabilität (κ) überprüft. Zusätzlich wird die HPV-Prävalenz in der Studienpopulation und in den Studienuntergruppen berechnet. Darüber hinaus wird die Frage gestellt, inwieweit ein positiver bzw. negativer HPV-Nachweis mit zytologischen bzw. histologischen Befunden korreliert. Außerdem wird eine mögliche Assoziation zwischen den Risikofaktoren Rauchverhalten und Anzahl der Sexualpartner und einem positiven HPV-Test kontrolliert. Zuletzt wird die Übereinstimmung der HPV-Nachweis-Ergebnisse von Lavagen und Abstrichen mit einer anderen Methode – Aptima-HPV-Test – geprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie wurden Frauen zwischen 20 und 30 Jahren eingeschlossen. Sie wurden entweder bei der Terminvereinbarung beim Gynäkologen oder durch einen Telefonanruf über Studienziel und -ablauf aufgeklärt. Alle eingeschlossenen Probandinnen stimmten der Studienteilnahme zu und unterschrieben ein Einverständnisformular.

Eine Studienteilnahme war nicht möglich, wenn Schwangerschaft, Geburt vor weniger als 30 Tagen oder eine Konisation in der Vorgeschichte vorlagen.

2.2 Ablauf der Rekrutierung

Die Patientinnen wurden im Zeitraum zwischen April 2009 und Januar 2010 an insgesamt fünf Standorten rekrutiert:

- Gynäkologische Dysplasiesprechstunde, Charité Campus Benjamin Franklin (CBF) (Dysplasie-Gruppe)
- Gynäkologische Dysplasiesprechstunde, Charité Campus Mitte (CCM) (Dysplasie-Gruppe)
- Gynäkologische Praxis Dr. Hagemann, Kiel (Screening-Gruppe)
- Gynäkologische Praxis Dr. Perlitz, Haldensleben (Dysplasie- und Screening-Gruppe)
- Gynäkologische Praxis Dr. Borchardt, Berlin (Screening-Gruppe)

Einige Wochen vor dem Termin beim Gynäkologen wurden die Patientinnen telefonisch kontaktiert. Die Patientinnen der Screening-Gruppe wurden durch den behandelnden Gynäkologen kontaktiert, die Patientinnen der Dysplasie-Gruppe durch die Promovendin.

Im Gespräch wurden die Ziele der Studie erläutert und der genaue Ablauf beschrieben. Die Patientinnen wurden explizit darauf hingewiesen, dass die Selbstabnahme im menstruationsfreien Intervall und vor dem Termin beim Gynäkologen durchzuführen ist. Die Patientinnen wurden gebeten auf Verwendung der vaginalen Zäpfchen bzw. Cremes zwei Tage vor der Selbstabnahme zu verzichten. Die Patientinnendaten –

Name, Geburtsdatum und Wohnadresse – wurden an das Robert Koch-Institut, Abteilung für Infektionsepidemiologie, übermittelt. Das Studienpaket mit dem folgenden Inhalt wurde durch das RKI verschickt:

- Patienteninformation (siehe Anhang)
- Einwilligungserklärung (siehe Anhang)
- Fragebogen zu demographischen Angaben, Sexualverhalten, Risikofaktoren, Krankengeschichte und Akzeptanz des Selbstabnahme-Sets (siehe Anhang)
- Selbstabnahme-Set mit Gebrauchsanweisung (siehe Anhang)
- Probenbehälter für gewonnene Spülflüssigkeit
- Postgeeignetes Verpackungsmaterial für den Probenbehälter (Vlies zur Ummantelung des Probenbehälters und festverschließbare Kunststoffhülle)
- Frankierter Rückumschlag

Bei Rückfragen hatten die Patientinnen die Möglichkeit sich beim RKI-Studententeam zu melden und beraten zu lassen.

Die Patientinnen wurden gebeten, die Probe innerhalb von 24 Stunden nach der Selbstabnahme im beiliegenden frankierten Briefumschlag an das RKI zu schicken. Alle Vaginallavage-Proben wurden durch das RKI verblindet und wöchentlich ans Labor für gynäkologische Tumorummunologie (GTI-Labor), CBF zur Aufarbeitung und HPV-Typisierung geschickt.

Der Ablauf der Studie wurde von dem Ethikkomitee der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (Antragsnummer EA2/129/08).

2.3 Selbstabnahme der Vaginallavage

Für die Durchführung der Vaginallavage wurde ein Selbstabnahmeset von der Firma Delphi Bioscience B.V. (ehemalige Pantarhei Devices B.V.) bereitgestellt. Jedes Set enthielt ein Selbstabnahmegerät (Screener) (Abb. 6) mit 5 ml einer sterilen isotonen Kochsalzlösung, einen Behälter zum Transport der Probe und eine ausführliche Gebrauchsanweisung (siehe Anhang). Das Selbstabnahmegerät war 22 cm lang, wovon der eigentliche Abnahmekolben 15 cm lang war. Der Durchmesser betrug 2 cm. Eine CE-Kennzeichnung lag vor.



Abb. 6: Delphi Bioscience B.V. Selbstabnahmegerät.

Die Selbstabnahme erfolgte im Liegen. Die Probandin sollte das Selbstabnahmegerät in die Scheide einführen und auf den Stempel drücken – dadurch umspülte die Flüssigkeit die Portio und die Scheide. Nach etwa fünf Sekunden ließ man den Stempel zurückgleiten – damit wurde die Flüssigkeit wieder in den Kolben des Screeners aufgenommen. Anschließend wurde die gewonnene vaginale Lavage aus dem Selbstabnahmegerät in den Transportbehälter entleert und dieser fest zugeschraubt. Dieser wurde zusammen mit dem Fragebogen per Post an das RKI gesendet. Das Selbstabnahmegerät wurde verworfen.

2.4 Gynäkologischer Abstrich

Beim jeweiligen Gynäkologen wurde ein Bürstenabstrich der Zervix und Portio zur HPV-Analyse (Cytobrush® plus-Bürste, CooperSurgical, Inc., U.S.A., Abb. 7). und zur zytologischen Untersuchung (Pap-Abstrich) gemacht. Bei einigen Patientinnen der Dysplasie-Gruppe wurde zusätzlich eine Biopsie für die histologische Untersuchung entnommen. Die HPV-Abstriche aus den Dysplasie Sprechstunden der Charité sowie aus der Praxis von Dr. Perlitz wurden direkt an das Labor für gynäkologische Tumorummunologie (GTI-Labor), CBF geschickt. Die Proben aus den Praxen Dr. Hagemann, Kiel und Dr. Borchardt, Berlin wurden an das RKI gesendet und dann wöchentlich, zusammen mit Lavage-Proben ans Labor geschickt. Die Abstrich-Proben wurden nicht verblindet, da die Ergebnisse den Frauen zeitnah mitgeteilt werden sollten. Durch Verblindung der Lavage-Proben wurde gewährleistet, dass keine Lavage-Probe einer Abstrich-Probe zugeordnet werden konnte.



Abb. 7: Bürste zum Abstrich. Die cytobrush wurde in ein steriles Mikrobiologie-Probenröhrchen gegeben und zum Labor transportiert.

2.5 Aufarbeitung von Vaginallavagen

Innerhalb von 24 Stunden nach dem Eintreffen der Vaginalspülungen ins Labor erfolgte die Asservierung. Zuerst wurden die Proben durch ausgiebiges Schütteln auf dem Vortexer (Scientific Laboratories) resuspendiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit in ein Eppendorf Reaktionsgefäß übertragen. Falls keine Flüssigkeit vorhanden war oder aber die Probe viel zu dickflüssig war, wurde der Behälter mit 1,5 ml PBS (engl. phosphate buffered saline) ausgespült, anschließend die Probe durch Schütteln auf dem Vortexer resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß übertragen. Im nächsten Schritt wurden die Proben zehn Minuten lang bei 2200 rpm (englisch: revolutions per minute, „Umdrehungen pro Minute“) zentrifugiert (Heraeus® Biofuge® primo R). Der entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde mit 400 µl PBS resuspendiert. Dann wurden 200 µl in ein separates Eppendorfgefäß überführt und für die DNA-Aufreinigung weiter bearbeitet. Der Rest wurde als Reserveprobe bei -80°C eingefroren. Die Arbeitsschritte der DNA-Aufreinigung sind identisch für Lavagen und für Abstriche und werden im Kapitel 2.6 erläutert.

2.6 Aufarbeitung von Abstrichen

Die Abstriche wurden einmal pro Woche aufgearbeitet und davor bei -20°C gelagert. Der Aufarbeitung der Abstriche und DNA-Aufreinigung lagen die etablierten und validierten SOP-Protokolle (Standard Operating Procedure) des GTI-Labors zugrunde.

Die Konservierung der Abstriche erfolgte nach SOP Nr. 1 (siehe Anhang). In jedes Abstrichröhrchen wurden 2 ml PBS pipettiert. Die Röhrchen wurden anschließend am Vortexer kräftig geschüttelt, bei Raumtemperatur zehn Minuten inkubiert und erneut am Vortexer kräftig geschüttelt. Danach wurde die Flüssigkeit in ein Eppendorf Reaktionsgefäß übertragen und fünf Minuten lang bei 2200 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet mit PBS resuspendiert. Die Hälfte der Suspension wurde in ein separates Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und als Reserveprobe bei -80°C eingefroren. Der Rest wurde für die DNA-Aufreinigung weiter verarbeitet.

Für die DNA-Aufreinigung der Lavagen und Abstriche wurde QIAamp® DNA Minikit (Qiagen GmbH, Hilgen) verwendet. Die Proben wurden zunächst mit QIAGEN Proteinase K versehen. Nach der Zugabe von Puffer und Ethanol wurde die Lösung in die speziellen mit Filter versehenen Reaktionsgefäße übertragen. Die Flüssigkeit wurde abzentrifugiert. Die Proben-DNA haftete dabei am Filter. Durch mehrere Waschschriffe wurde die DNA gereinigt. Zum Schluss wurde die DNA mit Hilfe von Elutionspuffer vom Filter gelöst und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß übertragen. Die genaue Vorgehensweise ist dem SOP Nr. 2 zu entnehmen (siehe Anhang).

2.7 HPV-Nachweis

2.7.1 PCR

PCR-basierte Systeme für den HPV Nachweis beruhen auf der Amplifikation der Zielregion, meistens innerhalb der L1-Region des Virus. Die am weitesten verbreiteten PCR-Systeme verwenden die generellen Primersets GP5+/6+, MY09/11 sowie SPF10. Diese amplifizieren alle verschiedenen HPV Typen. Die Genotypisierung erfolgt in einem weiteren Schritt.

Bei der GP-PCR wurde anfänglich der Primer GP5/GP6 mit einer Länge von 20 Nukleotiden eingesetzt. Diese Nukleotide waren homolog zu der korrespondierenden L1 ORF Region der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31 und 33. Die Zielsequenz umfasste eine Region von etwa 140-150 Basenpaaren der verschiedenen HPV-Genome und erlaubte den Nachweis von mindestens 26 verschiedenen HPV-Typen. Die General Primer GP5/GP6 wurden zuerst von Snijders et al. beschrieben (49). Diese Methode wurde von de Roda Husman et al. modifiziert, indem hochkonservierte Sequenzen in der Nähe

des 3'-Endes der GP5- und GP6-Primer mit eingeschlossen wurden: drei Nukleotide für GP5 und fünf Nukleotide für GP6 (GP5+/GP6+) (50). Dadurch verbesserte sich der HPV-Nachweis während der PCR. Zusätzlich wurde der GP6+ Primer mit Biotin gekoppelt (GP6+bio). Dieser dient während der Typisierung als Bindungsstelle für den Fluoreszenzmarker Streptavidin-PE. In der vorliegenden Studie wurde das Primersystem GP5+/6+ (GP6+bio) der Firma Eurofins® MWG GmbH (Ebersberg bei München) verwendet.

Um eine sehr hohe Genauigkeit in der Pilotstudie zu erreichen und um falschpositive/falschnegative Ergebnisse zu vermeiden, wurden für jede Probe zwei PCRs angesetzt – die HPV-Amplifizierung jeder Probe erfolgte zwei Mal. Bei widersprüchlichen Ergebnissen wurde die Messung wiederholt.

Jeder PCR-Ansatz von 50,2 µl enthielt 10 µl der extrahierten DNA, 5 µl des 10xReaktionspuffers, 0,2 µl jeder NTP Sorte (100 mM), 3,1 µl PCR-Primer 100 µM, 0,2 µl Taq Polymerase und 31,1 µl Wasser.

Die PCR fing bei 94°C mit der Denaturierung der DNA und der Aktivierung der Taq Polymerase an. Dieser Schritt dauerte 4 min. Danach folgten 40 Zyklen der DNA-Synthese. Jeder Zyklus bestand aus den folgenden drei Schritten: Denaturierung der DNA bei 94°C (Dauer 20 s), Bindung der Primer bei 38°C (Dauer 30 s) und DNA-Strangsynthese bei 71°C (Dauer 80 s). Die PCR endete mit einem DNA-Strangsyntheseschritt, der 4 min dauerte. Danach kühlte das System auf 8°C ab.

Bei HPV-negativen Proben musste überprüft werden, ob die Probe überhaupt DNA enthielt. Für diesen Zweck wurde die so genannte β -Globin-PCR durchgeführt (51; 52). Hierbei wurde spezifisch das Gen für menschliches β -Globin (Bestandteil des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin) vervielfältigt und nachgewiesen. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde auf ein 2%-iges Agarosegel mit dem DNA-Farbstoff Ethidiumbromid (10 µg/ml) aufgetragen. Nach 30 Minuten Laufzeit bei 100 V wurde das Ergebnis abgelesen. Der Nachweis einer β -Globin Bande (190 bp) bewies, dass die Probe menschliche DNA enthielt. Die Tatsache, dass bei der Typisierung keine HPV-Genotypen nachgewiesen wurden, bedeutete, dass die Probe tatsächlich HPV-negativ war. Wenn kein β -Globin nachgewiesen werden konnte, wurde die DNA Extraktion, PCR und Typisierung mit der Rückstellprobe wiederholt. Blieb das

Ergebnis negativ, war das Ergebnis der HPV-Typisierung ungültig. Solche Proben wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

2.7.2 HPV-Genotypisierung mittels Luminex-Technologie

Multiparameter-Testsysteme von Multimetrix basieren auf der Luminex-xMAP-Technologie und erlauben die simultane Quantifizierung von bis zu einhundert verschiedenen analytischen Parametern in einer einzigen Probe. Die xMAP (Multianalyt Profiling) – Technologie zur HPV Genotypisierung wurde durch Schmitt und Mitarbeiter entwickelt und beschrieben (51).

Grundlage der Technologie sind 5,6 µm kleine sphärische Polystyrolpartikel, so genannte Mikrosphären oder Beads. Die Mikrosphären sind mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen (Rot und Infrarot) gefärbt. Die Kombination dieser beiden Farbstoffe in jeweils zehn verschiedenen Konzentrationsstufen führt zu einhundert spektral unterscheidbaren Schattierungen von Rot und Infrarot und damit zu 100 Bead-Sorten, von denen jeder ein eigenes spezifisches Nachweisreagenz auf der Oberfläche tragen kann. In diesem Fall eine HPV typenspezifische Oligonukleotidsonde. Im Rahmen der aktuellen Studie wurde die selbsthergestellte Mischung aus verschiedenen Bead-Sorten (Bead-Mix) verwendet. Jede Bead-Sorte wurde vorher an die typenspezifische Oligonukleotidsonde gekoppelt.

Bei der Genotypisierung wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt. Zu den PCR-Produkten wurde der Bead-Mix pipettiert und die Proben wurden fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Darauf folgte die Inkubationszeit von 45 Minuten bei 41°C auf dem Schüttler. Das führte zur Bindung des PCR-Produkts an die typenspezifische Oligonukleotidsonde der jeweiligen Bead-Sorte. Je höher die Konzentration der viralen DNA in der Probe, desto mehr wurde davon gebunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben auf die Waschplatte übertragen und es erfolgte ein Waschschrift zur Entfernung nicht gebundener PCR-Produkte. Anschließend wurden die Proben mit einer Reporter-Fluoreszenz gefärbt – R-Phycoerythrin-Streptavidin. Aufgrund der biotinylierten GP6+bio Primer ist das PCR-Produkt mit einem Biotin-Molekül gekoppelt. Streptavidin bindet Biotin und dient als Fluoreszenzmarker. Es folgten mehrere Waschschriffe und anschließend die Luminex-Fluoreszenzmessung. Die Beads wurden einzeln im Laserstrahl analysiert und der Median der Fluoreszenz-Intensitäten (MFI)

errechnet. Die genaue Vorgehensweise ist dem SOP Nr. 8 zu entnehmen (siehe Anhang).

In der aktuellen Studie wurden 26 Bead-Sorten mit jeweils einer HPV typenspezifischen Oligonukleotidsonde gekoppelt. Dieser Beadmix ermöglichte die gleichzeitige Identifizierung von 15 HR-HPV-Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82), drei möglichen HR-Typen (26, 53 und 66) und acht LR-Typen (6, 11, 42, 43, 54, 57, 70 und 72).

Die Proben wurden positiv gewertet bei einem MFI-Wert, der gleich dem dreifachen Hintergrundwert oder größer war. Alle MFI-Werte, die darunter lagen, wurden als negativ gewertet.

2.8 Qualitätssicherung der Luminex-Technologie

Zur Qualitätssicherung der Luminex Technologie wurde durch Medizin-Technische Arbeiter des GTI-Labors ein Methodenäquivalenzversuch und ein Ringversuch in Zusammenarbeit mit dem IMD (Institut für Medizinische Diagnostik MVZ GbR; Berlin) durchgeführt. Das IMD führt die HPV-Diagnostik mittels Hybrid Capture II (HC2) Tests (Qiagen®) durch. Dieser ist ein auf direkter Hybridisierung basierender Test, der die DNA von 5 LR-HPV Typen (6, 11, 42, 43 und 44) und 13 HR-HPV Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68) im Pool nachweist, aber nicht genotypisiert. Der HC2-Test funktioniert folgendermaßen: Die gewonnene HPV-DNA wird aufgeschmolzen und bildet nach Zugabe spezifischer komplementärer HPV-RNA-Sonden DNA/RNA-Hybride. Diese werden anschließend in einem mit DNA/RNA-Hybrid-spezifischen Antikörpern beschichteten Röhrchen immobilisiert. Die fixierten Hybride können durch alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörper direkt gebunden werden. Nachdem nicht reaktives Material durch Waschung beseitigt wurde, wird ein chemilumineszentes Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugefügt. Die darauffolgende Lichtreaktion wird mit einem Luminometer photometrisch als sogenannte relative light units (RLUs) gemessen (53).

Da die DNA-Extraktion am IMD mittels Biorobot EZ1 der Firma Qiagen® durchgeführt wurde, sollte im Rahmen des Methodenäquivalenzversuchs zunächst nachgewiesen werden, dass die manuelle (GTI-Labor) und automatisierte (IMD) DNA-Extraktion aus

den Zervixabstrichen vergleichbare DNA-Mengen liefern. Dafür wurden durch das IMD 20 Proben mit dem unbekanntem HPV-Befund an das GTI-Labor zur manuellen DNA-Extraktion geschickt. Parallel lief die automatisierte DNA-Extraktion aus denselben Proben mittels EZ-1-Geräts von Qiagen im IMD. Die extrahierte DNA-Menge wurde durch Messung der Konzentration am Nanodrop (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) untersucht. Anschließend wurde HPV-Typisierung mittels Luminex-Technologie durchgeführt und mit den Ergebnissen der HC2 Messung verglichen. Dabei wurden folgende Grenzwerte festgelegt:

- Ergebnis der Proben mit einem MFI-Wert, der größer oder gleich der dreifachen Grundfluoreszenz war, wurde positiv gewertet
- Ergebnis der Proben mit einem MFI-Wert, der größer oder gleich der zweifachen Grundfluoreszenz, aber kleiner der dreifachen Grundfluoreszenz war, wurde als grenzwertig gewertet.

Im Rahmen des Ringversuchs wurden fünf verblindete Proben mit bekanntem HPV Status mittels des gleichen Verfahrens (Luminex-Technologie) in zwei verschiedenen Laboratorien (IMD und GTI-Labor) auf Vorliegen von HPV untersucht. Das IMD schickte die DNA-Proben von 5 Zervixabstrichen zur Genotypisierung mittels Luminex-Technologie ans GTI-Labor. Die Proben wurden bereits vom IMD mittels des gleichen Verfahrens auf Vorliegen von HPV untersucht. Die im GTI-Labor erzielten Ergebnisse wurden an das IMD übermittelt und mit den dort erhobenen Daten sowie mit den Daten des Ringversuchszentrums verglichen. Es galten dieselben Grenzwerte wie bei dem Methodenäquivalenzversuch.

2.9 APTIMA® HPV-Test

Um die Übereinstimmung der HPV-Nachweis-Ergebnisse von Lavagen und Abstrichen mit einer anderen Methode zu überprüfen wurden die Reserven von jeweils 75 Lavagen und 75 dazugehörigen Abstrichen an die medizinische Universität Tübingen, Sektion Experimentelle Virologie, zum Durchführen vom APTIMA-HPV-Test verschickt.

Der APTIMA HPV-Test erkennt im pool 14 High-Risk HPV-Typen: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68. Zielsequenzen der Nukleinsäuresonden des

APTIMA HPV Assays sind die messenger-RNA (mRNA) der viralen Onkogene E6 und E7.

Der APTIMA HPV-Test kombiniert drei molekularbiologische Technologien, die nacheinander in einem einzigen Reaktionsgefäß ablaufen. Die Ziel-mRNA wird zunächst mit komplementären Nukleinsäuresonden, die an magnetische Mikropartikel gebunden sind, hybridisiert. Anschließend wird zur Aufreinigung die mRNA samt Fänger-Oligomeren mithilfe eines Magneten an die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen und der Überstand kann extrahiert werden. Mithilfe der isothermen Transcription-Mediated-Amplification werden die RNA Proben vervielfältigt. Notwendig dazu sind eine Reverse Transkriptase, welche eine DNA-Kopie der mRNA erstellt und eine T7-RNA-Polymerase, die nach Bindung an einen Promotor auf der DNA-Kopie zahlreiche Kopien des mRNA-Amplikons erstellt. Zum Nachweis der Ziel-RNA werden Farbstoff-gekoppelte Nukleinsäuresonden hinzugegeben, welche nach Bindung an das Amplikon ein Lichtsignal erzeugen. Dieses wird als relative light units (RLU) qualitativ im Lumineszenzdetektor gemessen (54).

2.10 Datenerfassung und Auswertung

Die Ergebnisse der HPV-Typisierung wurden nach jeder Bestimmung an das RKI weitergeleitet. Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut, Abteilung für Infektionsepidemiologie, durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zweimal unabhängig voneinander von unterschiedlichen Personen in das Datenerfassungsprogramm EpiData® Vers. 3.1 der dänischen Firma EpiData Association (Ottensee, Dänemark) eingegeben. Nach Zusammenführen der Doppelteingaben und Kontrolle der Fehlermeldungen wurden sämtliche im Datenerfassungsprogramm gespeicherten Daten (Laborergebnisse, Fragebögen) in das Statistikprogramm Stata® Vers. 11.0 der U.S. amerikanischen Firma StataCorp LP (Texas, USA) exportiert und ausgewertet.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Testverfahren (Vaginallavage und gynäkologischer Abstrich) wurde mit Hilfe der Interrater-Reliabilität (κ) überprüft (55). Eine gute Übereinstimmung wurde bei $\kappa \geq 0,6$ angenommen (56). Der Chi-Quadrat-Test diente zur Signifikanztestung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die Prävalenz mit dem entsprechenden 95% Konfidenzintervall (95% KI)

wurde für die gesamte Studienpopulation und die Studiengruppen bezogen auf alle HPV-Typen, HR-HPV, HPV 16 und LR-HPV berechnet. Neben der deskriptiven Analyse der Daten wurden die Angaben der Studienteilnehmerinnen nach den Variablen „Rauchverhalten“ und „Anzahl der Sexualpartner“ stratifiziert. Eine mögliche Assoziation zwischen den ausgewählten Variablen (Risikofaktoren) und einem positiven HPV-Test wurde mittels logistischer Regression durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Probandinnen und Proben

Zwischen April 2009 und Januar 2010 wurden insgesamt 237 Frauen telefonisch für die Studienteilnahme rekrutiert. Davon wurden je nach Vorgeschichte 70 der Dysplasie-Gruppe und 167 der Screening-Gruppe zugeteilt.

Die Verteilung der Studienteilnehmerinnen sieht man in Abbildung 8. Alle 237 für die Studienteilnahme gewonnenen Patientinnen erhielten auf dem Postweg das Studienpaket. Davon schickten 182 (76,9%) Frauen die vaginale Lavage und den ausgefüllten Fragebogen an das RKI zurück. Von diesen haben 14 Frauen den Termin beim Gynäkologen nicht wahrgenommen, bei einer Patientin konnte der Abstrich aufgrund der Regelblutung nicht durchgeführt werden und ein weiterer Abstrich ging auf dem Postweg verloren. Letztendlich lagen bei 166 Probandinnen beide Proben und ein ausgefüllter Fragebogen vor. Davon konnten 10 Patientinnen aufgrund der fehlenden β -Globin-DNA (in 9 Lavagen und in einem Abstrich) bei der Datenauswertung nicht berücksichtigt werden. Somit bildeten 156 Probandinnen (65,8% der rekrutierten Frauen) die Studienpopulation. 55 kamen aus der Dysplasie-Gruppe und 101 aus der Screening-Gruppe.

Der Altersmedian der Frauen in der gesamten Studienpopulation (n=156) lag bei 25,6 Jahren (95% KI, 25,1-26,0), in der Dysplasie-Gruppe (n=55) bei 26,1 (95% KI, 25,3-27,0) und in der Screening-Gruppe (n=101) bei 25,2 Jahren (95% KI, 24,7-25,8).

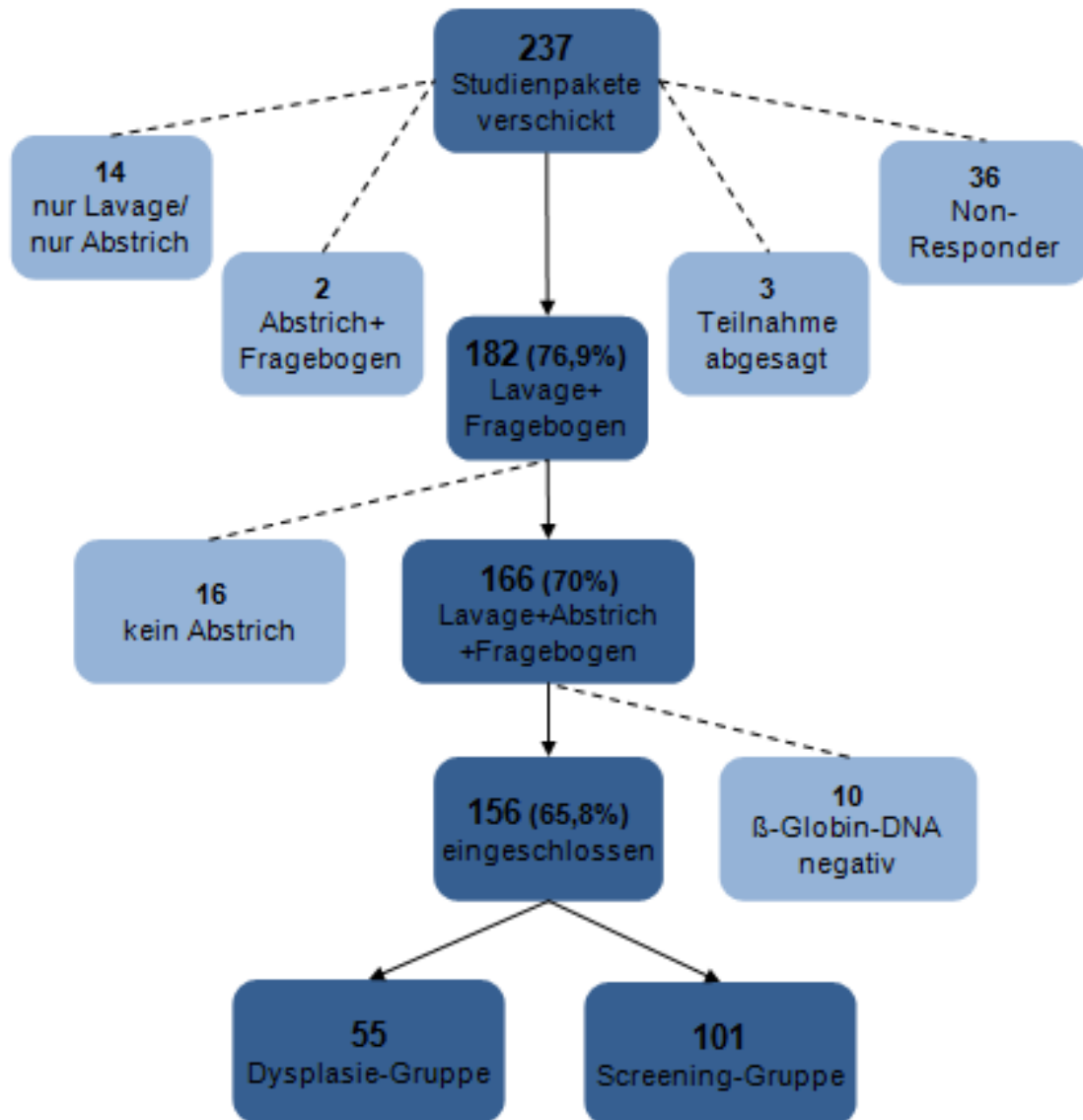


Abb. 8: Verteilung der Studienteilnehmerinnen.

3.2 Übereinstimmung der Ergebnisse: Lavage versus Zervixabstrich

3.2.1 Alle HPV-Typen

Betrachtet man alle HPV-Genotypen, so wurde bei 60 von 156 Frauen in beiden Proben mindestens eine Infektion mit HR- und / oder LR-HPV nachgewiesen. Bei insgesamt 43 von 60 (71,7%) Frauen lagen die vollständig identischen Befunde vor. Bei 74 von 156 Frauen waren beide Proben HPV-negativ. Bei 22 Frauen gab es keine

Ergebnisse

Übereinstimmung zwischen den Lavagen und Abstrichen. Die Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden liegt für das ganze Studienkollektiv bei $\kappa = 0,72$ (Tab. 5).

In der Dysplasie-Gruppe stimmten bei 46 von 55 Frauen die Befunde in beiden Proben vollständig oder teilweise überein. Bei 9 Frauen konnte keine Übereinstimmung nachgewiesen werden. Der ermittelte κ -Wert liegt für die Dysplasie-Gruppe bei 0,62.

In der Screening-Gruppe lagen bei 87,1% (88 von 101) der Frauen übereinstimmende Ergebnisse vor. Bei 13 Frauen lieferten Lavage und Abstrich unterschiedliche Befunde. Der errechnete κ -Wert beträgt für diese Gruppe 0,71.

Tab. 5: Übereinstimmung der Ergebnisse Lavage vs. Abstrich in der gesamten Studienpopulation, in der Dysplasie-Gruppe und in der Screening-Gruppe für alle HPV-Typen.

Abstrich	Lavage					
	gesamte Studienpopulation (n=156)		Dysplasie-Gruppe (n=55)		Screening-Gruppe (n=101)	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg
pos	60	9	33	5	27	4
neg	13	74	4	13	9	61
κ (95% KI)	0,72 (0,61-0,83)		0,62 (0,40-0,85)		0,71 (0,57-0,86)	

3.2.2 HR-HPV-Typen

Betrachtet man nur HR-HPV-Typen beim Ergebnisvergleich der beiden Methoden beträgt κ als Übereinstimmungsmaß für die ganze Studienpopulation 0,76 (Tab. 6). Bei 88,5% (138 von 156) der Frauen stimmten die Ergebnisse überein, das heißt sowohl in der Lavage als auch im Abstrich wurden HR-HPV-Typen nachgewiesen oder beide Proben waren negativ für HR-Typen. Von 53 Frauen mit dem HR-HPV-Nachweis in beiden Proben lagen bei 37 (69,8%) vollständig übereinstimmende Ergebnisse vor.

Ergebnisse

In der Dysplasie-Gruppe stimmten bei 46 von 55 (83,6%) der Frauen die Ergebnisse der beiden Proben überein (beide Proben HR-HPV-positiv / beide Proben HR-HPV-negativ). Kappa beträgt in diesem Fall 0,65.

In der Screening-Gruppe lieferten 91,1% der Lavage-Abstrich-Paare gleiche Ergebnisse: beide Proben enthielten HR-HPV-DNA oder waren negativ für HR-Typen. Die Übereinstimmung der Ergebnisse liegt bei $\kappa = 0,78$.

Tab. 6: Übereinstimmung der Ergebnisse Lavage vs. Abstrich in der gesamten Studienpopulation, in der Dysplasie-Gruppe und in der Screening-Gruppe für HR-HPV-Typen.

Abstrich	Lavage					
	gesamte Studienpopulation (n=156)		Dysplasie-Gruppe (n=55)		Screening-Gruppe (n=101)	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg
pos	53	9	30	5	23	4
neg	9	85	4	16	5	69
κ (95% KI)	0,76 (0,66-0,86)		0,65 (0,44-0,86)		0,78 (0,64-0,92)	

3.2.3 HPV 16

Wenn man ausschließlich die Übereinstimmung der Ergebnisse für HPV 16 betrachtete, wurde folgendes beobachtet: bei 146 von 156 (93,6%) Studienteilnehmerinnen wurde in der Lavage und im Abstrich HPV 16 nachgewiesen bzw. beide Proben enthielten keine DNA von HPV 16. Diese sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse erkennt man auch anhand von $\kappa = 0,82$ (Tab. 7).

In der Dysplasie-Gruppe wurden in diesem Zusammenhang 51 übereinstimmende Probenpaare detektiert: beide Proben enthielten HPV 16 DNA bzw. waren beide HPV 16 negativ. Ein sehr gutes Übereinstimmungsmaß von $\kappa = 0,84$ wurde berechnet.

In der Screening-Gruppe lagen bei 95 von 101 Frauen Probenpaare mit gleichen Ergebnissen bezogen auf HPV 16 vor. Damit wurde ein Kappa von 0,78 ermittelt.

Ergebnisse

Tab. 7: Übereinstimmung der Ergebnisse Lavage vs. Abstrich in der gesamten Studienpopulation, in der Dysplasie-Gruppe und in der Screening-Gruppe für HPV 16.

Abstrich	Lavage					
	gesamte Studienpopulation (n=156)		Dysplasie-Gruppe (n=55)		Screening-Gruppe (n=101)	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg
Pos	31	4	18	2	13	2
Neg	6	115	2	33	4	82
κ (95% KI)	0,82 (0,71-0,93)		0,84 (0,70-0,99)		0,78 (0,61-0,95)	

3.2.4 LR-HPV-Typen

Wird nur die Infektion mit LR-HPV beim Vergleich der Ergebnisse berücksichtigt, beträgt κ als Übereinstimmungsmaß für die ganze Studienpopulation 0,74 (Tab. 8). Bei 94,2% (147 von 156) der Frauen wurde in der Lavage und im Abstrich LR-HPV-DNA nachgewiesen bzw. beide Proben enthielten keine DNA von LR-HPV-Typen. Von 15 Frauen mit dem LR-HPV-Nachweis in beiden Proben lagen bei 14 (93,3%) vollständig übereinstimmende Ergebnisse vor.

In der Dysplasie-Gruppe wurden für LR-HPV bei 52 von 55 (94,5%) Frauen übereinstimmende Ergebnisse in beiden Proben ermittelt (LR-HPV-DNA vorhanden oder nicht). Das Maß der Übereinstimmung beträgt hier 0,77.

Für die Screening-Gruppe wurde für diesen Zusammenhang $\kappa = 0,75$ berechnet. Hier konnten bei 95 von 101 (94,1%) Frauen übereinstimmende Ergebnisse in Lavagen und Abstrichen ermittelt werden.

Tab. 8: Übereinstimmung der Ergebnisse Lavage vs. Abstrich in der gesamten Studienpopulation, in der Dysplasie-Gruppe und in der Screening-Gruppe für LR-HPV-Typen.

Abstrich	Lavage					
	gesamte Studienpopulation (n=156)		Dysplasie-Gruppe (n=55)		Screening-Gruppe (n=101)	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg
pos	15	1	6	0	9	1
neg	8	132	3	46	5	86
κ (95% KI)	0,74 (0,58-0,90)		0,77 (0,52-1,00)		0,75 (0,57-0,94)	

3.3 HPV-Prävalenz

Bei der Berechnung der HPV-Prävalenz wurden die Probandinnen, welche zumindest in einer der beiden Methoden (Lavage und / oder Abstrich) einen positiven HPV-Nachweis hatten, als HPV-positiv eingestuft. HPV-negativ galten Frauen, bei welchen in beiden Methoden keine HPV-DNA nachgewiesen wurde.

3.3.1 HPV-Prävalenz

Bei 82 von 156 (52,6%) Frauen wurde entweder im Abstrich oder in der Lavage bzw. in den beiden Proben HPV-DNA (LR und / oder HR) nachgewiesen (95% KI, 44,4–60,6). Dem entsprechend waren 47,4% der Frauen in beiden Proben HPV-negativ.

In der Dysplasie-Gruppe hatten 42 von 55 (76,4%) Frauen einen positiven HPV-Nachweis in mindestens einer Probe (95% KI, 63,0–86,8). 23,6% (13 von 55) der Frauen waren HPV-negativ.

39,6% (40 von 101) der Frauen in der Screening-Gruppe waren HPV-positiv (95% KI, 30,0–49,8).

Die Abbildung 9 zeigt die HPV-Prävalenz in der gesamten Studienpopulation und in den Studiensubgruppen.

3.3.2 HR-HPV-Prävalenz

Für das Vorkommen und die Verteilung von HR-HPV-Typen wurden folgende Werte berechnet: 45,5% der Frauen der gesamten Studienpopulation (95% KI, 37,5–53,7), 70,9% der Frauen aus der Dysplasie-Gruppe (95% KI, 57,1-82,4) und knapp ein Drittel (31,7%) der Frauen aus der Screening-Gruppe (95% KI, 22,8-41,7) hatten zumindest in einer der beiden Proben einen positiven HR-HPV-Nachweis.

3.3.3 Prävalenz von HPV 16

HPV 16 war der häufigste Typ in der gesamten Studienpopulation und in den beiden Studiengruppen. Bei 26,3% des gesamten Kollektivs wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung entweder in der Lavage oder im Abstrich oder in beiden Methoden die DNA von HPV 16 detektiert (95% KI, 19,6–34,0). Davon waren prozentual gesehen mehr als doppelt so viele Frauen in der Dysplasie-Gruppe wie in der Screening-Gruppe betroffen: 40% (95% KI, 27,0-54,1) versus 18,8% (95% KI, 11,7-27,8).

3.3.4 LR-HPV-Prävalenz

15,4% der Frauen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung mit LR-HPV infiziert (95% KI, 10,1–22,0). Im Gegensatz zur Prävalenz von allen HPV-Typen und HR-HPV-Typen waren die Werte in diesem Fall in den beiden Studiengruppen nahezu identisch: bei 16,4% (95% KI, 7,8–28,8) der Frauen aus der Dysplasie-Gruppe und bei 14,9% (95% KI, 8,6–23,3) der Frauen aus der Screening-Gruppe wurde in der Lavage und / oder im Abstrich eine Infektion mit LR-HPV diagnostiziert.

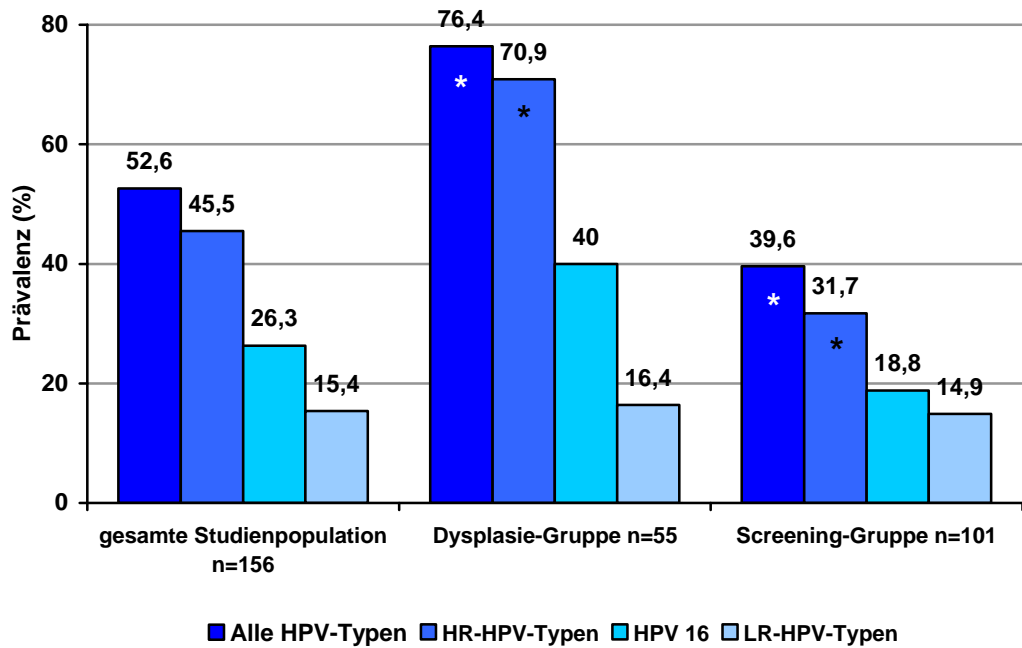


Abb. 9: HPV-Prävalenz in der ganzen Studienpopulation und Studiengruppen bezogen auf alle HPV-Typen, HR-HPV-Typen, HPV-16 und LR-HPV-Typen. Mit * sind Ergebnisse mit dem signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen markiert.

3.4 HPV-Genotypen Verteilung

Die Proben wurden insgesamt auf 26 HPV-Typen untersucht. Davon waren

- 15 HR-HPV-Typen: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82
- 3 mögliche HR-HPV-Typen: 26, 53 und 66
- und 8 LR-HPV-Typen: 6, 11, 42, 43, 54, 57, 70 und 72

Die potentiellen HR-HPV-Typen wurden bei der HPV-Prävalenzberechnung als HR-Typen behandelt. In der ganzen Studienpopulation wurden von diesen 26 Genotypen 20 nachgewiesen. HR-HPV 59, mögliches HR-HPV 26 und LR-HPV 11, 57, 70 und 72 kamen bei den Probandinnen nicht vor.

In der Dysplasie-Gruppe wurden 16 HPV-Typen detektiert. Zusätzlich zu den oben aufgeführten wurden HR-HPV 31, 35 und 73 und LR-HPV 43 bei keiner Probandin nachgewiesen.

Ergebnisse

In der Screening-Gruppe kamen 18 HPV-Genotypen vor. Zusätzlich zu den oben aufgeführten konnten HR-HPV 33 und 58 nicht detektiert werden. Es wurden aber HPV 31, 35, 73 und 43 detektiert.

In den Lavagen wurden insgesamt 19 HPV-Typen nachgewiesen, in den Abstrichen kamen 18 Genotypen vor. HPV 35 und 73 wurden nur in den Lavagen nachgewiesen (in jeweils einer Probe), HPV 31 – nur in den Abstrichen (in zwei Proben). Die Aufteilung der Genotypen, bis auf die HPV-Typen 53 und 54, war unter Lavagen und Abstrichen annähernd gleich. HPV 53 und 54 dagegen wurden in jeweils sechs Lavagen gefunden, aber nur in zwei Abstrichen (HPV 53) bzw. in einem Abstrich (HPV 54). Die Häufigkeit, mit der die verschiedenen HPV-Typen in den selbstentnommenen zervikovaginalen Lavagen und in den zervikalen Abstrichen vorkamen, kann man der Tabelle 9 entnehmen.

Tab. 9: Häufigkeit der HPV-Typen in den selbstentnommenen zervikovaginalen Lavagen und in den zervikalen Abstrichen, angegeben in Anzahl der Proben mit dem detektierten HPV-Typ.

HPV-Typ	Zervikovaginale Lavage	Zervikaler Abstrich
6	6	4
16	37	35
18	3	3
31	0	2
33	2	2
35	1	0
39	7	5
42	12	10
43	1	1
45	3	3
51	2	3
52	10	7
53	6	2
54	6	1
56	8	9
58	1	1
66	4	4
68	2	3
73	1	0
82	1	3

Der häufigste Genotyp in der Studienpopulation und in den beiden Studiengruppen war, wie bereits erwähnt, HPV 16. Der zweithäufigste HPV-Typ im gesamten Kollektiv und in der Screening-Gruppe war LR-HPV-Typ 42, entsprechend 8,3% (13 von 156) und 8,9% (9 von 101). In der Dysplasie-Gruppe wurden HR-HPV 39 und 52 bei jeweils 9,1% (5 von 55) der Frauen nachgewiesen und gehören hier somit beide zum zweithäufigsten HPV-Genotyp. Der Tabelle 10 kann man die Häufigkeit (in %), mit der

Ergebnisse

die einzelnen Genotypen in der Studienpopulation und in den Untergruppen vorkamen, entnehmen.

Tab. 10: Häufigkeit der HPV-Genotypen in der Studienpopulation und in den Subgruppen.

Gesamte Studienpopulation n=156	Dysplasie-Gruppe n=55	Screening-Gruppe n=101
HPV-Typ (Häufigkeit %)		
16 (26,3%)	16 (40%)	16 (19%)
42 (8,3%)	39, 52 (9,1%)	42 (9%)
56 (7,7%)	6, 42, 56 (7,3%)	56 (8%)
52 (7,1%)	54 (5,5%)	52 (6%)
39 (4,5%)	18, 33, 45, 51, 58, 66 (3,6%)	53 (5%)
6, 53, 54 (3,8%)	53, 68, 82 (1,8%)	54, 66 (3%)
66 (3,2%)		6, 31, 39, 45, 68, 82 (2%)
45 (2,6%)		18, 35, 43, 51, 73 (1%)
18, 51, 68, 82(1,9%)		
31, 33, 58(1,3%)		
35, 43, 73(0,6%)		

Es wurden mehr Mehrfachinfektionen (≥ 2 HPV-Genotypen) in den Lavagen (16,7%) (95% KI, 11,2-23,5) als in den Abstrichen (12,8%) (95% KI, 8,0-19,1) gefunden.

In der Dysplasie-Gruppe wurden mehr Mischinfektionen als in der Screening-Gruppe entdeckt, entsprechend 23,6% (95% KI, 13,2-37,0) und 16,8% (95% KI, 10,1-25,6).

3.4.1 HPV-Infektion und Alter

Es wurde der Zusammenhang zwischen dem Alter der Probandinnen und dem Vorkommen von HPV-Infektion und HPV-Mischinfektionen (≥ 2 HPV-Genotypen) in Lavagen und in Abstrichen untersucht. Dabei wollte man herausfinden, ob die jüngeren

Ergebnisse

Frauen häufiger von der HPV-Infektion bzw. HPV-Mischinfektion betroffen sind. Dafür wurden die drei Altersgruppen gebildet:

- 20- bis 23-jährige Frauen (n = 35)
- 24- bis 26-jährige Frauen (n = 53)
- 27- bis 30-jährige Frauen (n = 68)

Wie man der Abbildung 10 entnehmen kann, kommt im Studienkollektiv die HPV-Infektion in der Altersgruppe von 20- bis 23-jährigen Frauen am Häufigsten vor. 54,3% der Frauen dieser Altersgruppe hatten einen positiven HPV-Nachweis in der Lavage, 57,1% im Abstrich.

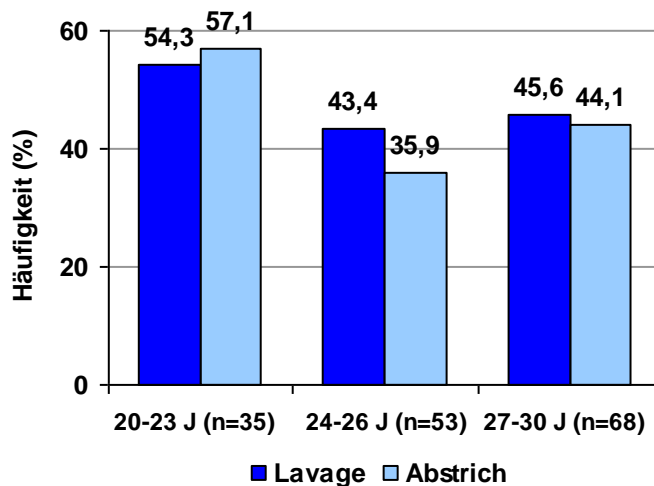


Abb. 10: Häufigkeit der HPV-Infektion (in %) in den Lavagen und in den Abstrichen in den verschiedenen Altersgruppen der Studienpopulation.

Lavagen und Abstriche aller HPV-positiven Frauen wurden auf Anteil von Mischinfektionen untersucht. Insgesamt 36,6% aller Frauen mit dem positiven HPV-Nachweis in den Lavagen oder Abstrichen bzw. in beiden Proben waren mit zwei oder mehr HPV-Typen infiziert. Wie die Abbildung 11 zeigt wurden Mischinfektionen in der Altersgruppe von 24- bis 26-jährigen Frauen am häufigsten gefunden. Bei HPV-positiven Frauen dieser Altersgruppe wurde in 47,8% der Lavagen bzw. 36,8% der Abstriche eine Infektion mit zwei oder mehr HPV-Typen nachgewiesen.

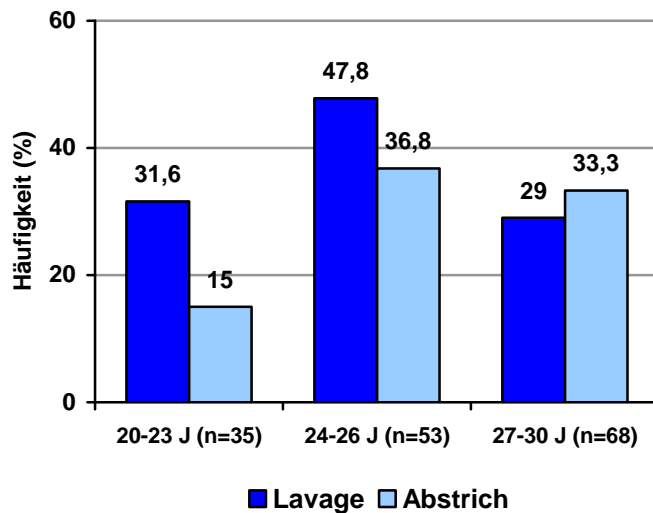


Abb. 11: Häufigkeit der Mischinfektionen (in %) bei HPV-positiven Frauen in den Lavagen und in den Abstrichen in den verschiedenen Altersgruppen der Studienpopulation.

3.5 Rauchverhalten und Sexualpartneranzahl

Es ist bekannt, dass Nikotinabusus und Promiskuität zu den Risikofaktoren bei der Entstehung von Zervixkarzinomen gehören (57; 58) und mit der höheren HPV-Prävalenz assoziiert sind (59; 60). Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, ob in den beiden Studiengruppen (Dysplasie- vs. Screening-Gruppe) bei den Probandinnen Unterschiede im Rauchverhalten und in der Anzahl der Sexualpartner bestehen und ob beide Risikofaktoren mit der höheren HPV-Prävalenz assoziiert sind. Als Grundlage für die Berechnung der Werte dienten die Probandinnenangaben aus den 184 Fragebögen.

3.5.1 Rauchverhalten

Alle 184 Frauen haben Angaben zum Rauchverhalten gemacht. Von diesen waren 44% Raucher und 56% Nichtraucher. In der Dysplasie-Gruppe rauchten 51,7% der Frauen, in der Screening-Gruppe 40,3% (Abb. 12). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist nicht signifikant ($p \chi^2 = 0,146$).

Ergebnisse

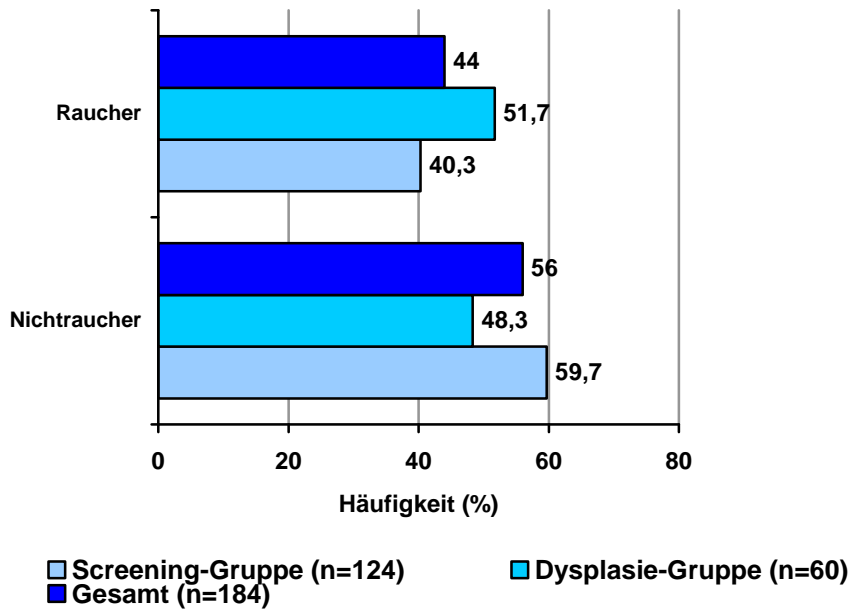


Abb. 12: Rauchverhalten in der gesamten Studienpopulation und in den Studiensubgruppen.

Die Raucherinnen der gesamten Studienpopulation hatten eine doppelt so hohe Chance (Odds ratio: 2,025) für HPV-Infektion als Nichtraucherinnen. In der Dysplasie-Gruppe ist die Chance einer HPV-Infektion bei Raucherinnen 1,5 fach erhöht, in der Screening-Gruppe doppelt so hoch (Tab. 11).

Tab. 11: Zusammenhang von Rauchverhalten und HPV-Infektion in der gesamten Studienpopulation, Dysplasie-Gruppe und Screening-Gruppe.

Rauchen und HPV-Infektion	Odds Ratio	SD	p chi ²	95% KI
Gesamte Studienpopulation (n=184)	2,025	0,615	0,020	1,11-3,67
Dysplasie-Gruppe (n=60)	1,543	0,097	0,461	0,48-4,88
Screening-Gruppe (n=124)	2,043	0,761	0,055	0,98-4,24

3.5.2 Anzahl der Sexualpartner

Von 184 Frauen haben 181 die Frage nach der Anzahl der Sexualpartner beantwortet. Eine Probandin in der Dysplasie-Gruppe und zwei Weitere in der Screening-Gruppe ließen die Frage unbeantwortet. Es standen die Angaben von 59 Frauen der Dysplasie-Gruppe und 122 Frauen der Screening-Gruppe zur Verfügung

Zur Auswertung wurden die Probandinnen in folgende Gruppen eingeteilt: 0 - 1, 2 - 4 sowie 5 und mehr Sexualpartner (Abb.13).

Keine der Frauen aus der Dysplasie-Gruppe und 14 Frauen aus der Screening-Gruppe haben 0 - 1 Partner angegeben. 14 Frauen aus der Dysplasie-Gruppe und 49 aus der Screening-Gruppe haben zwei bis vier Partner angegeben. Fünf oder mehr verschiedene Sexualpartner benannten insgesamt 104 der befragten Frauen, davon kamen 45 Frauen aus der Dysplasie Gruppe und 59 Frauen aus der Screening Gruppe. Bei einem $p \text{ chi}^2 = 0,002$ waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen signifikant.

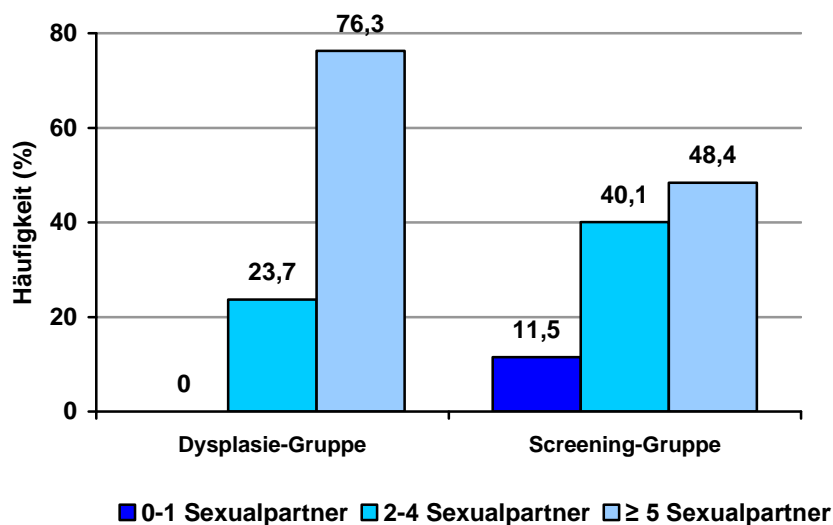


Abb. 13: Anzahl der Sexualpartner in der Studienpopulation (n=181).

In beiden Studiengruppen wuchs das Risiko einer HPV-Infektion mit der Anzahl der Sexualpartner, wobei dies deutlicher in der Dysplasie-Gruppe ausgeprägt war: Odds-Ratio bei 5 und mehr Sexualpartnern 4,6 versus 2,0 in der Screening-Gruppe (Tab. 12).

Tab. 12: Einfluss der Anzahl der Sexualpartner auf HPV-Infektion in Dysplasie-Gruppe und Screening-Gruppe.

Sexualpartnerzahl und HPV-Infektion	Odds Ratio	SD	p chi ²	95% KI
Dysplasie-Gruppe (n=59)	4,6	3,06	0,021	1,26-16,91
Screening-Gruppe (n=122)	2,0	1,23	0,263	0,59-6,66

3.6 Korrelation von HPV-Nachweis mit zyto- und histologischen Befunden

Um die Frage zu beantworten inwieweit die positiven bzw. negativen HPV-Nachweise mit den Ergebnissen des Pap-Tests bzw. der Biopsien korrelieren, wurden die Pap-Test- und Biopsiebefunde der Probandinnen bei den gynäkologischen Praxen angefordert bzw. in der Datenbank der Charité gesucht.

3.6.1 Anteil der Probandinnen mit zytologischen bzw. histologischen Befunden

Durch die Anfrage bei den behandelnden Gynäkologen bzw. die Suche in der Datenbank der Charité gelang es, die Pap-Test- bzw. Biopsiebefunde von 147 von 156 (94,2%) Frauen in die Auswertung mit einzubeziehen. In der Dysplasie-Gruppe lagen bei 48 von 55 Probandinnen die Befunde vor, in der Screening-Gruppe war das bei 99 von 101 Probandinnen der Fall. Bei 22 Frauen lagen sowohl der zytologische als auch der histologische Befund vor. Bei diesen Probandinnen wurde der histologische Befund bei der Auswertung berücksichtigt, da dieser genauer ist.

74,1% (109 von 147) der Frauen hatten einen normalen zytologischen (Pap I oder II) bzw. histologischen Befund (kein CIN). Dem entsprechend lag bei 25,9% der Frauen ein auffälliger Befund vor (Pap \geq III bzw. CIN \geq I / Cis).

96% der Frauen aus der Screening-Gruppe hatten einen unauffälligen Pap-Test (I oder II). Lediglich bei 4 von 99 Probandinnen lag ein auffälliger Pap-Befund (IIIId) vor. Biopsien wurden bei keiner der Frauen durchgeführt.

Ergebnisse

In der Dysplasie-Gruppe hatten nur 29,2% (14 von 48) der Frauen einen unauffälligen Befund (Pap II bzw. kein CIN). Pap I lag bei keiner dieser Frauen vor. 70,8% der Frauen hatten einen auffälligen Pap-Test (\geq III) bzw. Biopsiebefund (CIN \geq I / Cis).

Die Aufteilung der Befunde zwischen den Studiensubgruppen ist der Abbildung 14 zu entnehmen.

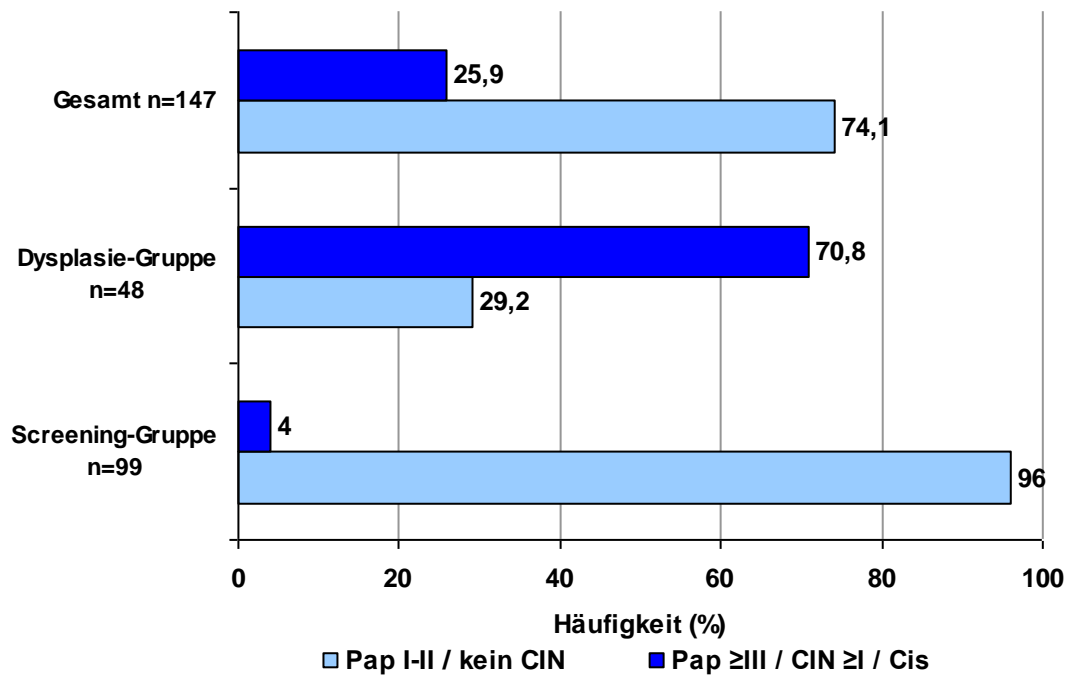


Abb. 14: Zytologische und histologische Befunde in der gesamten Studienpopulation und in den Studiensubgruppen.

3.6.2 Zytologie/Histologie bei HPV-positiven Frauen

93 von 147 (63,3%) Frauen hatten identische Befunde: positiver HPV-Test und auffällige Zyto-/Histologie bzw. negativer HPV-Test und unauffällige Zyto-/Histologie. Dementsprechend lag bei 36,7% (54 von 147) Probandinnen ein diskrepanter Befund vor. Bei 78 von 147 Frauen mit einem bekannten Pap-Test bzw. Biopsiebefund wurde in der Lavage oder Abstrich bzw. in beiden Proben eine HPV-Infektion nachgewiesen. Von diesen hatten 47 Frauen (60,3%) eine unauffällige Zytologie bzw. Histologie. 69 Frauen waren HPV negativ, 7 davon (10,1%) hatten jedoch einen abnormen Pap- oder Biopsie-Befund (Tab. 13).

3.6.3 Zytologie bei HR-HPV-positiven Frauen

101 von 147 (68,7%) Frauen hatten identische Befunde: Nachweis von HR-HPV und auffällige Zyto-/Histologie bzw. Fehlen von HR-HPV und unauffällige Zyto-/Histologie. Dementsprechend lag bei 31,3% (46 von 147) Probandinnen ein diskrepanter Befund vor. Bei 68 von 147 Frauen mit einem bekannten Pap-Test bzw. Biopsiebefund wurde in der Lavage und / oder im Abstrich eine Infektion mit einem oder mehreren HR-HPV-Typen diagnostiziert. Von diesen hatten 38 (55,9%) einen unauffälligen Pap- bzw. Biopsie-Befund. Bei 79 Frauen wurden keine HR-HPV nachgewiesen, 8 davon (10,1%) hatten jedoch eine abnorme Zyto-/Histologie.

Tab. 13: Korrelation von HPV-Befunden mit den zytologischen und histologischen Befunden in der gesamten Studienpopulation, alle HPV-Typen und HR-HPV-Typen.

n=147 Pap/Biopsie	HPV		HR-HPV	
	pos	neg	pos	neg
Auffällig	31	7	30	8
Unauffällig	47	62	38	71

3.7 Qualitätssicherungen der Luminex-Technologie

Zur Qualitätssicherung der Luminex-Technologie wurde diese zum einen im Rahmen des Methodenäquivalenzversuchs mit dem HC2-Test verglichen. Zum anderen wurde ein Ringversuch durchgeführt, wobei dieselben Proben mittels des gleichen Verfahrens (Luminex-Technologie) in zwei verschiedenen Laboratorien (IMD und GTI-Labor) auf Vorliegen von HPV untersucht wurden.

3.7.1 Methodenäquivalenzversuch

Im Rahmen des Methodenäquivalenzversuchs sollte zunächst nachgewiesen werden, dass die manuelle (GTI-Labor) und die automatisierte (IMD) DNA-Extraktion aus den Zervixabstrichen vergleichbare DNA-Mengen liefern. Dabei wurde festgestellt, dass die automatische Extraktion mittels EZ1-Gerät der Firma Qiagen® der manuellen

Aufarbeitung gleichwertig ist. Mit beiden Methoden wurde vergleichbar viel DNA isoliert. Der Mittelwert bei der manuellen Extraktion betrug 43,19 ng/µl (minimaler Wert 20,64 ng/µl; maximaler Wert 151,61 ng/µl). Mit dem EZ1-Gerät wurde durchschnittlich etwas mehr (1,4-fach) DNA isoliert. Der Mittelwert betrug 59,28 ng/µl (minimaler Wert 29,08; maximaler Wert 122,88 ng/µl).

Im zweiten Schritt wurden die Ergebnisse der Genotypisierung mit denen des HC2-Tests verglichen. Bei 16 von 20 (80%) Proben lag ein übereinstimmendes Ergebnis vor. Bei einer der vier Proben mit dem diskrepanten Ergebnis wurden bei der Genotypisierung 5 HR-HPV-Typen nachgewiesen. Der HC2-Test war aber sowohl HR- als auch LR-HPV-positiv. In einer Probe lag der MFI-Wert für LR-HPV 6 zwischen der einfachen und der zweifachen Grundfluoreszenz. Dem entsprechend wurde die Probe als HPV-negativ gewertet. Im HC2-Test wurde jedoch eine LR-HPV-Infektion nachgewiesen. Bei einer weiteren Probe wurde im HC2-Test HR-HPV nachgewiesen das Ergebnis der Genotypisierung war jedoch negativ für LR- und HR-HPV. Beim letzten diskrepanten Ergebnis schließlich wurde mittels Luminex-Technologie HR-HPV 59 detektiert, im HC2 wurde jedoch neben HR-HPV auch LR-HPV nachgewiesen.

3.7.2 Ringversuch

Im Rahmen des Ringversuchs wurden insgesamt fünf Proben untersucht. Bei vier von fünf Proben wurden übereinstimmende Ergebnisse erzielt. Bei einer Probe lag ein diskrepantes Ergebnis vor. Im GTI-Labor wurde bei der Genotypisierung dieser Probe kein HPV nachgewiesen. Durch das IMD wurde jedoch in derselben Probe HPV 16 detektiert. Aus diesem Grund wurde durch das IMD die DNA aus der Probenreserve extrahiert und an das GTI-Labor zur Wiederholung der Genotypisierung geschickt. Diesmal wurde auch hier der HPV-Typ 16 nachgewiesen. Letztendlich lagen bei allen fünf Proben in beiden Methoden übereinstimmende Ergebnisse vor.

3.8 APTIMA® HPV-Test

Insgesamt 75 Lavage-Abstrich-Paare wurden zusätzlich zu GP 5+/6+ PCR mit anschließender Luminex-Genotypisierung mit APTIMA-HPV-Test auf HPV-Infektionen untersucht. Bei 12 von 150 Proben wurden bei der Genotypisierung lediglich LR-HPV nachgewiesen. Da der APTIMA-Test nur HR-HPV nachweist (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,

Ergebnisse

51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68), wurden diese Proben beim Vergleich der Ergebnisse als negative Proben behandelt.

Wie man der Tabelle 14 entnehmen kann, hatten 127 von 150 (84,6%) Proben in beiden Methoden identische Befunde. Betrachtet man die Übereinstimmung nur in den Lavagen, so bekommt man folgende Werte: bei den 65 von 75 (86,7%) Lavagen stimmten die Ergebnisse der beiden Methoden überein.

Beim Vergleich der Methoden in den Abstrichen lagen bei 82,7% (62 von 75) der Abstriche identische Befunde (in beiden Methoden HR-HPV positiv bzw. HR-HPV negativ) vor.

Tab. 14: APTIMA® HPV-Test vs. Luminex-Genotypisierung. Nur HR-HPV-Typen.

APTIMA	Luminex					
	Lavagen und Abstriche n=150		Lavagen n=75		Abstriche n=75	
	pos	neg	pos	neg	Pos	Neg
pos	76	3	40	2	36	1
neg	20	51	8	25	12	26

Es ließen sich für die beide Methoden folgende Sensitivität und Spezifität berechnen:

	Sensitivität	Spezifität
• Luminex:	96	72
• APTIMA:	79	94

4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Prüfung der Übereinstimmung von HPV-Genotypisierungsergebnissen der zervikalen Bürstenabstriche und der selbstentnommenen zervikovaginalen Lavagen. Zusätzlich wurde die HPV-Prävalenz in der Studienpopulation und in den Studiensubgruppen berechnet und die Korrelation des HPV-Nachweises mit den zytologischen Befunden überprüft. Im Folgenden werden die wichtigsten aus der Studienpopulation erhobenen Daten kritisch analysiert und mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen. Darüber hinaus wird eine Assoziation zwischen ausgewählten Risikofaktoren und einem positiven HPV-Test, die Ergebnisse der zur Qualitätssicherung der Luminex-Technologie durchgeführten Versuche und die des Aptima-HPV-Tests diskutiert.

4.1 Methodenvergleich: zervikovaginale Lavage versus Zervixabstrich

Eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Testverfahren (Selbstabnahme und Bürstenabstrich beim Frauenarzt) wurde in der vorliegenden Studie bei $\kappa \geq 0,6$ angenommen. Laut Brennan und Silman spricht man von einer guten Übereinstimmung bei Kappa-Werten zwischen 0,61 und 0,8. Die höheren Werte deuten auf eine sehr gute Übereinstimmung (56). Kappa-Werte wurden für das gesamte Studienkollektiv und für die Studiensubgruppen bezogen auf alle HPV-Typen, auf HR-HPV, auf HPV 16 und auf LR-HPV berechnet. Alle ermittelten Werte liegen über dem festgelegten Grenzwert. Der niedrigste Wert liegt bei $\kappa = 0,62$ für alle HPV Typen und der höchste bei $\kappa = 0,84$ für HPV 16 Nachweis. Beide wurden für die Übereinstimmung der Ergebnisse in der Dysplasie-Gruppe berechnet. Die für die gesamte Studienpopulation errechneten Kappa-Werte variieren je nach Parameter zwischen 0,72 für alle HPV-Typen und 0,82 für HPV 16. In der Screening-Gruppe liegt der niedrigste Kappa-Wert bei 0,71 (Übereinstimmung bezogen auf alle HPV-Typen). Der Höchste wurde für die Parameter HR-HPV-Typen und HPV 16 berechnet und liegt bei 0,78.

Bei Betrachtung der gesamten Studienpopulation oder der zwei Subgruppen fällt auf, dass die niedrigsten Kappa-Werte für die Übereinstimmung beider Methoden bezogen auf alle HPV-Typen berechnet wurden. Diesen Sachverhalt könnte man

folgendermaßen erklären: Beim gynäkologischen Bürstenabstrich werden gezielt die Zellen von der Transformationszone der Zervix und aus dem endozervikalen Kanal entnommen. Somit können vorwiegend die zervikalen HPV-Infektionen diagnostiziert werden. Bei der Durchführung der Selbstabnahme dagegen wird die ganze Portio und der oberer Teil der Vagina mit der Flüssigkeit umspült. Dadurch kann zusätzlich zur zervikalen Infektion auch eine vaginale HPV-Infektion entdeckt werden. Andererseits sind die tief endozervikal sitzenden Infektionen besser mit dem intrazervikalen Bürstenabstrich als mit der vaginalen Lavage nachzuweisen.

Die höchsten Kappa-Werte wurden in der gesamten Studienpopulation und in den Subgruppen für HPV 16 berechnet. Die gute bis sehr gute Übereinstimmung beider Methoden könnte mit der hohen Virulenz von HPV 16 und mit der daraus folgenden hohen Viruslast zusammenhängen. Deswegen wird HPV-16-Infektion, falls vorhanden, mit beiden Methoden gut nachgewiesen.

Die niedrigsten Kappa-Werte für die Übereinstimmung beider Methoden wurden in der Dysplasie-Gruppe berechnet und beziehen sich auf alle HPV-Typen und HR-HPV-Typen. Die deutlich bessere Übereinstimmung in der Screening-Gruppe liegt unter anderem am hohen Anteil von HPV- bzw. HR-HPV-negativen Frauen in dieser Gruppe. Zum Vergleich: 60,4% der Probandinnen in der Screening-Gruppe und lediglich 23,6% in der Dysplasie-Gruppe sind HPV-negativ. Ähnlich sieht es für HR-HPV aus: 68,3% der Frauen in der Screening-Gruppe vs. 29,1% in der Dysplasie-Gruppe sind HR-HPV-negativ. Da die Screening-Gruppe zwei Drittel des Studienkollektivs ausmacht, wird auch in der gesamten Population bessere Übereinstimmung als in der Dysplasie-Gruppe nachgewiesen, was sich in höheren Kappa-Werten widerspiegelt.

Im Jahr 2006 wurden in den Niederlanden die Ergebnisse zu einer ähnlichen Untersuchung veröffentlicht (61). In die Studie wurden insgesamt 96 Frauen im Alter zwischen 18 und 59 Jahren (medianes Alter 35 Jahre) eingeschlossen. 64 Frauen hatten auffällige zytologische Befunde, 32 waren gesunde Probandinnen. Wie in der aktuellen Studie wurden alle Frauen gebeten die Selbstabnahme mittels Screener der Firma Pantarhei® (seit Januar 2010 Delphi Bioscience®) zu Hause durchzuführen und sich eine Woche später beim Gynäkologen zum zervikalen Bürstenabstrich vorzustellen. Der HPV-Test erfolgte mittels GP5+/6+ PCR-Enzymimmunoassay (PCR-EIA), was den Nachweis von 15 HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82), drei potenziellen HR-HPV-Typen (26, 53 und 66) und HPV-Typ 67

ermöglichte. Bei Proben mit einem positiven Ergebnis im PCR-EIA folgte die HPV-Genotypisierung mittels reverse line blotting (RLB). Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden wurde, wie auch in der aktuellen Studie, mit Hilfe der Interrater-Reliabilität (κ) überprüft (61).

Der bei Brink et al. berechnete Kappa-Wert beträgt 0,71, was auf eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse hinweist (56). Der Wert bezieht sich auf Vorkommen von HR-HPV in der gesamten Studienpopulation. Eine gesonderte Kappa-Bestimmung für die Gruppe von Frauen mit auffälliger Zytologie (n=64) und gesunde Frauen (n=32) erfolgte nicht. In der vorliegenden Studie wurde, bezogen auf denselben Parameter (HR-HPV-Typen), der Kappa-Wert in Höhe von 0,76 für das ganze Studienkollektiv berechnet. Damit wurde in beiden Studien eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden (zervikaler Bürstenabstrich vs. selbstentnommene zervikovaginale Lavage) nachgewiesen.

Der Unterschied zwischen den beiden errechneten Werten (0,71 vs. 0,76) kann durch mehrere Faktoren zustande kommen. Zum Einen wurden in die aktuelle Studie mehr Frauen (n = 156) eingeschlossen als bei Brink et al. (n = 96). In der aktuellen Studie ist die Verteilung zwischen Frauen mit der auffälligen Zytologie und gesunden Frauen etwa eins zu zwei (55 vs. 101 Frauen). Bei Brink et al. liegt ein genau umgekehrtes Verhältnis vor: 64 Frauen mit der auffälligen Zytologie vs. 32 gesunde Frauen. Außerdem besteht ein großer Unterschied im Alter der Probandinnen. In die aktuelle Studie wurden Frauen zwischen 20 und 30 Jahren eingeschlossen, der Altersmedian der Studienpopulation liegt bei 25,6 Jahren. Bei Brink et al. waren die Probandinnen 18 bis 59 Jahre alt mit dem Altersmedian 35 Jahre. Darüber hinaus wurden in den Studien unterschiedliche HPV-Nachweisverfahren angewendet. Bei Brink et al. wurde HPV-Infektion mittels GP5+/6+ PCR-Enzymimmunoassay mit nachfolgender HPV-Genotypisierung von positiven Proben mittels RBL diagnostiziert. In der aktuellen Studie wurde aus den Proben extrahierte DNA zunächst mittels GP+5/+6 PCR amplifiziert. Anschließend folgte die HPV-Genotypisierung aller Proben mittels innovativer Luminex-Technologie. Schließlich besteht der Unterschied im Spektrum des HPV-Nachweises: in der aktuellen Studie wurden die Proben auf Vorkommen von HR- und LR-HPV-Infektion untersucht, bei Brink et al. nur auf HR-HPV.

Da bei Brink et al. die Proben nur auf Vorliegen einer HR-HPV-Infektion getestet wurden, gibt es keinen Vergleich für die in der aktuellen Studie errechneten Kappa-Werte, die sich auf HR- und / oder LR-HPV bzw. nur auf LR-HPV beziehen.

In der aktuellen Studie wurde HPV-Typ 16 am häufigsten nachgewiesen. Der höchste κ -Werte wird berechnet, wenn man ausschließlich die Übereinstimmung der Ergebnisse für HPV 16 betrachtet. Für diesen Parameter wurde durch $\kappa = 0,82$ eine sehr gute Übereinstimmung beider Methoden nachgewiesen. Auch bei Brink et al. war HPV 16 der häufigste Genotyp. Eine Kappa-Berechnung für diesen Parameter wurde jedoch nicht durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse von HPV-Genotypisierungen aus selbstdurchgeführten vaginalen Spülungen und aus durch Gynäkologen abgenommenen Abstrichen vergleichbar sind. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit dem konventionellen Bürstenabstrich sprechen für den Einsatz der Methode und des Selbstabnahme-Sets in der Hauptstudie deutschlandweit.

4.2 HPV-Prävalenz

4.2.1 Gesamte Studienpopulation

Bei 52,6% der Frauen wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung in der Lavage oder im Abstrich oder in beiden Proben eine HPV-Infektion diagnostiziert. Eine Infektion mit HR-HPV-Typen lag bei 45,5% der Probandinnen vor. 26,3% aller Frauen hatten einen positiven Nachweis für HPV-Typ 16. Eine alleinige LR-HPV-Infektion lag bei 15,4% der Studienteilnehmerinnen vor. Im Vergleich zur im November 2010 veröffentlichten Studie zur HPV-Prävalenz in Deutschland (44) und zu früheren Studien in einzelnen Bundesländern (46; 45; 47; 48), wurde in der aktuellen Studie eine höhere Prävalenz ermittelt. Als mögliche Erklärung dafür kommen mehrere Faktoren in Betracht.

In der aktuellen Studie wurden bei der HPV-Prävalenzberechnung die HPV-Nachweise aus beiden Proben – zervikovaginale Lavage und Zervixabstrich – berücksichtigt. Das heißt, die Probandinnen, welche zumindest in einer der beiden Proben einen positiven HPV-Nachweis hatten, wurden als HPV-positiv eingestuft. In allen früheren Studien wurde nur durch Zervixabstrich gewonnenes Material auf HPV untersucht.

In die aktuelle Untersuchung wurden Frauen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren eingeschlossen. Somit repräsentiert das Studienkollektiv die Bevölkerungsgruppe mit der höchsten HPV-Prävalenz (41; 42; 43). Nur bei Iftner et al. durften die untersuchten Frauen nicht älter als 30 Jahre sein. Jedoch gehörten Frauen, die jünger als 20 Jahre waren, auch zur Studienpopulation: die jüngsten Studienteilnehmerinnen stammen aus der Altersgruppe der 10- bis 16-jährigen (44). In den früheren Studien wurde die Gruppe der 20- bis 30-jährigen Frauen entweder gar nicht erfasst, wie bei Petry et al. (45), oder es wurden Frauen aller Altersgruppen untersucht (46; 47). In die RKI-Studie wurden nur Frauen im Alter zwischen 20 und 40 Jahren eingeschlossen (48).

Über ein Drittel der Frauen in der aktuellen Studie wurde in der gynäkologischen Dysplasieambulanz der Charité (CCM/CBF) rekrutiert, wo sie aufgrund der auffälligen zytologischen Befunde behandelt wurden. Die hohe HPV-Prävalenz in der ganzen Studienpopulation kann man unter anderem durch dieses Frauenkollektiv mit hoher HPV-Prävalenz erklären. Auch Speich und Mitarbeiter haben die Proben der Frauen mit einer auffälligen Zytologie bei der Prävalenzberechnung mitberücksichtigt. Bei insgesamt 41% aller untersuchten Proben wurde der Verdacht auf eine Dysplasie geäußert (46). Trotzdem wurde bei Speich und Mitarbeitern eine wesentlich niedrigere HPV-Prävalenz (32,5%) als in der aktuellen Studie (52,6%) ermittelt. Dieser Unterschied kann wiederum an den bereits genannten Faktoren liegen. Bei Petry und Schneider gehörten bekannte CIN bzw. auffälliger Pap-Test in der Vorgeschichte zu den Ausschlusskriterien (45; 47). Bei der RKI-Studie wurden Frauen mit einer symptomatischen Genitalinfektion von der Teilnahme ausgeschlossen (48). In der Studie von Iftner et al. wurden die Probandinnen in den gynäkologischen Praxen rekrutiert. Alle Frauen suchten den Gynäkologen wegen der jährlichen Vorsorgeuntersuchung auf (44).

In der vorliegenden Untersuchung wurden sowohl HR- als auch LR-HPV-Typen bestimmt. In zwei der früheren Studien (45; 47) wurden nur HR-Typen nachgewiesen. In diesen Studien wurden die niedrigsten HPV-Prävalenzen ermittelt (6,4% und 7,9%). Die Ursache dafür ist aber vor allem der Einschluss der älteren Frauen mit niedriger Prävalenz.

Der HPV-Nachweis erfolgte in der aktuellen Studie mittels eines sehr sensitiven Verfahrens. Die DNA wurde nach der Extraktion mit Hilfe von GP5+/6+ PCR amplifiziert. Das ermöglicht einen HPV-Nachweis auch bei geringer Anzahl von HPV-

infizierten Zellen in der untersuchten Probe. Anschließend erfolgte die HPV-Genotypisierung mittels der Luminex-Technologie. Drei der früheren Studien wendeten PCR bei der HPV-Bestimmung an (46; 47; 48). Zwei Studien verwendeten HC2-Test als HPV-Nachweismethode (44; 45).

Bei Iftner und Kollegen wurden 1692 Frauen in die Studie eingeschlossen (44). Die Probandinnenzahl in den früheren Studien variiert zwischen 2916 (46) und 8466 Frauen (45). In der vorliegenden Studie wurde nur eine relativ kleine Stichprobe von 156 Frauen untersucht, da das primäre Ziel ein Methodenvergleich war. Diese Pilotstudie bildet die Basis für eine spätere Prävalenzstudie an repräsentativ ausgewählten Frauen von 20-25 Jahren.

4.2.2 Studiensubgruppen

Wie auch erwartet, wurde bei Frauen in der Dysplasie-Gruppe eine höhere HPV-Prävalenz berechnet, als bei denen aus der Screening-Gruppe: 76,4 vs. 39,6 Prozent. Betrachtet man die Infektion mit HR-HPV-Typen, so sind 2,2-mal mehr Frauen in der Dysplasie-Gruppe als in der Screening-Gruppe infiziert. Ein ähnlicher Sachverhalt wird für die HPV-16-Prävalenz beobachtet: doppelt so viele Frauen in der Dysplasie-Gruppe wie in der Screening-Gruppe waren zum Zeitpunkt der Untersuchung mit HPV 16 infiziert. Lediglich für die Infektion mit LR-HPV-Typen wird in den Studiengruppen die gleiche Prävalenz ermittelt. Für die Entwicklung von Zervixdysplasie ist die persistierende Infektion mit HR-HPV-Typen verantwortlich. Aus diesem Grund wurden bei den Frauen mit auffälligen Zytologiebefunden deutlich häufiger HR-HPV und HPV 16 nachgewiesen. Da LR-HPV seltener mit den Krebsvorstufen assoziiert sind, erscheint es logisch, dass prozentual gesehen bei vergleichbar vielen Frauen in der Dysplasie-, wie in der Screening-Gruppe LR-HPV nachgewiesen wurde.

In der Dysplasie-Gruppe waren 76,4% der Frauen HPV-positiv. Diesen Wert könnte man mit den Ergebnissen aus den Studien vergleichen, welche HPV-Prävalenz bei Frauen mit auffälligen Zytologiebefunden untersuchten. Bei Evans et al. wurden 561 Frauen zwischen 15 und 30 Jahren untersucht. 476 (85%) dieser Frauen hatten einen auffälligen zytologischen Befund im Moment der Aufnahme in die Studie. Unter 561 Frauen wurde eine HPV-Prävalenz von 86% ermittelt (62). Bei Gonzalez-Bosquet et al. wurden 215 Frauen mit einer auffälligen Zytologie auf Vorliegen einer HPV-Infektion untersucht. Bei Frauen unter 35 Jahren wurde eine ähnliche HPV-Prävalenz (85,6%)

wie bei Evans und Mitarbeitern berechnet (63). Die höhere Prävalenz in den beiden Studien kann daran liegen, dass 85% der Frauen (62) bzw. alle Frauen (63) abnorme zytologische Befunde aufwiesen. In der aktuellen Studie lagen nur bei 87,3% (48 von 55) der Frauen in der Dysplasie-Gruppe zytologische bzw. histologische Befunde vor. Davon hatten 70,8% (34 von 48) der Frauen zum Zeitpunkt der Untersuchung einen auffälligen zytologischen (\geq Pap III) bzw. histologischen (\geq CIN I) Befund.

Bei Iftner et al. wurden Frauen, die den Gynäkologen zur jährlichen Vorsorge aufsuchten, untersucht. Die HPV-Prävalenz lag in der Altersgruppe von 20- bis 30-jährigen bei 25% (44). In der aktuellen Studie betrug die HPV-Prävalenz im vergleichbaren Studienkollektiv (Screening-Gruppe) 39,6%. Der Unterschied liegt zum Einen darin, dass für die HPV-Prävalenzberechnung in der vorliegenden Untersuchung, wie bereits erwähnt, HPV-Nachweise sowohl aus zervikovaginalen Lavagen als auch aus Zervixabstrichen berücksichtigt wurden. Zum anderen könnte der höhere Wert in der aktuellen Studie durch die sensitivere HPV-Nachweismethode zustande kommen.

4.3 HPV-Typenverteilung

Von 26 untersuchten HPV-Genotypen wurden in der Studienpopulation 20 nachgewiesen. HPV 11, 26, 57, 59, 70 und 72 kamen bei den Probandinnen nicht vor. Hierbei handelt es sich auch um HPV Typen mit einer relativ niedrigen Prävalenz in den anderen Studien (64; 65). In den zervikovaginalen Lavagen kamen insgesamt 19 Genotypen vor, in den Zervixabstrichen 18. Bis auf zwei Ausnahmen (HPV 53 und 54) wurden die einzelnen HPV-Typen etwa gleich oft in den Lavagen und in den Abstrichen nachgewiesen. HPV 53 und 54 dagegen wurden in jeweils 6 Lavagen aber nur in einem (HPV 54) bzw. zwei (HPV 53) Abstrichen diagnostiziert.

Bei Brink wurden 19 HPV-Typen typisiert, wovon vier – HPV 26, 45, 73 und 82 – weder in den Lavagen noch in den Abstrichen detektiert wurden. Auch hier wurden alle Typen annähernd gleich oft in beiden Proben gefunden. In den Lavagen wurden 15 verschiedene HPV-Typen nachgewiesen, in den Abstrichen 14 (61).

HPV 16 war in der vorliegenden Untersuchung der häufigste Genotyp. Er wurde in 37 (23,7%) Lavagen und in 35 (22,4%) Abstrichen nachgewiesen. Danach folgten HPV 42, 56, 52 und 39. HPV-Typ 18 steht auf dem neunten Platz, er wurde lediglich bei 2% der Frauen nachgewiesen. Bei Iftner et al. wurden die Proben mit einem positiven Ergebnis

im HC2-Test der HPV-Genotypisierung mittels PapilloCheck und SPF10 unterzogen. HPV 16 war der häufigste Typ in beiden Verfahren. Dem folgten bei PapilloCheck-Messung HPV 42, 51, 56 und 31. Bei der SPF10-Genotypisierung waren HPV 51, 31, 52 und 66 die häufigsten Typen nach HPV 16. HPV 18 kam in der Häufigkeitsreihe in beiden Genotypisierungsverfahren an elfter Stelle (44). Die Tatsache, dass HPV 18 selten vorkommt, jedoch etwa 20 Prozent der Zervixkarzinome verursacht, spricht für seine hohe Karzinogenität.

In der vorliegenden Studie wurden Mischinfektionen (≥ 2 HPV-Genotypen) häufiger in den Lavagen nachgewiesen: 16,7% aller Lavagen und 12,8% aller Abstriche enthielten zwei oder mehr HPV-Typen. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Diesen Sachverhalt könnte man folgendermaßen erklären: beim gynäkologischen Bürstenabstrich werden gezielt die Zellen von der Transformationszone der Zervix und aus dem endozervikalen Kanal entnommen. Bei der Durchführung der Selbstabnahme dagegen wird die ganze Portio und der oberer Teil der Vagina durch die Flüssigkeit umspült. Somit wird nicht nur die zervikale Infektion, sondern, im Falle einer vaginalen HPV-Infektion, auch diese entdeckt. Allerdings wurden bei Brink et al. genauso viele Mischinfektionen in den Lavagen wie in den Bürstenabstrichen von der Zervix nachgewiesen (61).

HPV-Infektion und Alter

Beim Untersuchen des Zusammenhangs zwischen HPV-Infektion und Alter wurde in der vorliegenden Studie festgestellt, dass die Frauen der Altersgruppe zwischen 20 und 23 Jahren am Häufigsten von HPV-Infektionen betroffen sind, gefolgt von der Gruppe der Frauen zwischen 27 und 30 Jahren. Die Altersgruppe der 24- bis 26-jährigen Frauen wies, prozentual gesehen, die niedrigste HPV-Prävalenz auf. Der Zusammenhang wurde sowohl bei der Prävalenzberechnung in Lavagen als auch in den Abstrichen beobachtet. Diese Werte kann man jedoch nur bedingt mit den Ergebnissen aus anderen Studien vergleichen. Wie bereits erwähnt bilden die Patientinnen aus der Dysplasie-Sprechstunde der Charité 35% der Studienpopulation. Zum einen haben diese Frauen als selektierte Gruppe eine höhere HPV-Prävalenz, da sie auf Grund der Auffälligkeiten im zytologischen Abstrich bzw. Biopsiebefund in die Dysplasiesprechstunde überwiesen wurden. Zum anderen sind die Probandinnen aus der Dysplasie-Gruppe logischerweise älter als die aus der Screening-Gruppe, da damit aus einer HPV-Infektion eine CIN entstehen kann muss die Infektion in der Regel

mehrere Monate bis Jahre persistieren (Altersmedian 26,1 in der Dysplasie-Gruppe vs. 25,2 in der Screening-Gruppe). Beim Vergleich der Daten mit den Ergebnissen zur HPV-Prävalenz bei Frauen zwischen 20 und 30 Jahren von Iftner und Mitarbeiterinnen stellt man fest, dass in dieser Studie die höchste Prävalenz bei 20- bis 22-jährigen Frauen lag (44). Im Gegensatz zu unseren Daten sinkt bei Iftner et al. die Prävalenz mit steigendem Alter, so dass Frauen zwischen 27 und 30 die niedrigste Prävalenz aufweisen. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch andere europäische Studien zur HPV-Prävalenz. In Dänemark ist die HPV-Prävalenz bei 20- bis 24-jährigen Frauen am höchsten, sinkt dann kontinuierlich bis zum Alter von etwa 40 Jahren und zeigt ab diesem Alter keine signifikante Veränderung (64). Unter belgischen Frauen sind 20- bis 24-jährige am häufigsten von einer Infektion mit HR-HPV betroffen (43). Auch hier wird mit dem steigenden Alter die kontinuierliche Abnahme der Prävalenz beobachtet.

In der aktuellen Studie wurde bei 36,6% aller Frauen mit positivem HPV-Nachweis in der Lavage oder im Abstrich oder in beiden Proben eine Infektion mit zwei oder mehr HPV-Typen nachgewiesen. Mischinfektionen wurden in der Altersgruppe von 24- bis 26-jährigen Frauen am häufigsten gefunden: bei 47,8% der HPV-positiven Frauen dieser Gruppe wurde eine Infektion mit zwei oder mehr HPV-Typen in der Lavage und bei 36,8% im Abstrich nachgewiesen. Auch diese Daten sind aus oben erwähnten Gründen nur mit Einschränkung mit den Ergebnissen anderer Studien zu vergleichen.

Bei Kjær et al wurden Dünnschichtzytologie-Proben von 11.617 am Zervixkarzinom-Screening teilnehmenden Frauen zwischen 15 und 93 Jahren untersucht (64). 3.069 (26,4%) waren HPV-positiv. Bei 54,3% der HPV-positiven Frauen wurde eine Mischinfektion nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe untersuchte auch den Zusammenhang zwischen Vorkommen von HR-HPV-Mischinfektion und Alter und fand heraus, dass diese bei 20- bis 24-jährigen Frauen am häufigsten ist (64).

4.4 Rauchverhalten und Sexualpartneranzahl

Es wurde bereits in mehreren Studien bewiesen, dass Nikotinabusus und Promiskuität das Risiko am Zervixkarzinom zu erkranken, erhöhen (57; 58) und mit höherer HPV-Prävalenz einhergehen (59; 60).

Auch in unserer Studie wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern und HPV-Infektion gefunden. Zwar war der Unterschied im Rauchverhalten

in beiden Studiengruppen nicht signifikant (p $\chi^2 = 0,146$). Es wurde aber bei Raucherinnen der gesamten Studienpopulation eine doppelt so hohe Chance (Odds ratio: 2,025) für HPV-Infektion beobachtet als bei Frauen, die nicht rauchten. In der Dysplasie-Gruppe war die Chance einer HPV-Infektion bei Raucherinnen etwas niedriger (Odds ratio: 1,543) als in der Screening-Gruppe (Odds ratio: 2,043). In diesem Fall sind Rauchen und Dysplasie keine unabhängigen Parameter. In der Dysplasie-Gruppe ist der Parameter Rauchen untergeordnet wichtig, da die Frauen auf die Dysplasie hin selektioniert wurden.

Die Probandinnen in beiden Studiengruppen unterschieden sich signifikant in ihrem Sexualverhalten. In beiden Studiengruppen wuchs das Risiko einer HPV-Infektion mit der Anzahl der Sexualpartner, wobei dies deutlicher in der Dysplasie-Gruppe ausgeprägt war: Odds-Ratio bei 5 und mehr Sexualpartnern 4,6 versus 2,0 in der Screening-Gruppe.

Bei Vacarella und Mitarbeitern wurden über elftausend Frauen in elf Ländern auf HPV-Infektion untersucht und bezüglich Sexual- und Rauchverhalten befragt (59; 60). Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern und Häufigkeit der HPV-Infektion nachgewiesen werden. Mit der steigenden Zahl der Sexualpartner und der gerauchten Zigaretten pro Tag steigt auch das Risiko HPV positiv zu sein.

4.5 Korrelation von HPV-Nachweis mit zyto- und histologischen Befunden

Um die Übereinstimmung zwischen dem HPV-Nachweis und den zytologischen bzw. histologischen Befunden zu beurteilen, wurde die Vierfeldertafel erstellt. Es wurde die Übereinstimmung in der gesamte Studienpopulation bezogen auf alle HPV-Typen und HR-HPV-Typen überprüft.

Bei 94,2% (147 von 156) der Probandinnen lagen zytologische bzw. histologische Befunde vor. Davon hatten 74,1% (109 von 147) der Frauen eine unauffällige Zytologie (Pap I oder II) bzw. Histologie (kein CIN). Dem entsprechend lag bei 25,9% der Frauen ein auffälliger Befund vor (Pap \geq III bzw. CIN \geq I / Cis).

Wie erwartet hatte der überwiegende Anteil (96%) der Frauen aus der Screening-Gruppe einen unauffälligen Pap-Test. In der Dysplasie-Gruppe war das bei weniger als einem Drittel der Probandinnen der Fall. Die Ergebnisse des HPV-Tests und Pap-Tests bzw. Biopsie korrelierten zu 63,3% (93 von 147 Frauen) bezogen auf alle HPV-Typen und zu 68,7% (101 von 147 Frauen) bezogen auf HR-HPV-Typen. Bei den diskrepanten Ergebnissen handelte es sich zum größten Teil um die Konstellation positiver HPV-Test – negative Zytologie. Das war der Fall bei 47 Frauen, wenn man alle HPV-Typen betrachtet und bei 38 Frauen, wenn man nur HR-HPV-Typen betrachtet. Bei 7 bzw. 8 der diskrepanten Testergebnisse lag ein negativer HPV-Befund und ein positiver Pap-Befund bzw. Biopsie-Befund vor. Den ersten Sachverhalt kann man leicht erklären, denn eine HPV-Infektion muss nicht zwingend mit einer Zellveränderung einhergehen. Möglicherweise handelte es sich um eine frische Infektion. Es kann aber auch eine persistierende Infektion sein, die jedoch noch keine Zellveränderung nach sich gezogen hat. Aus diesem Grund wird der HPV-Test als Teil der Vorsorge erst für Frauen ab 30 Jahren empfohlen (66). Bei jüngeren Frauen ist ein HPV-Test nicht spezifisch genug (67), da die meisten Infektionen sich spontan zurückbilden. Das trifft auf unsere Studienpopulation zu, denn die Probandinnen waren zwischen 20 und 30 Jahren alt. Möglich ist auch, dass eine Dysplasie vorhanden war, die jedoch nicht vom Abstrich erfasst wurde.

Der Grund für die zweite Konstellation (HPV-Test negativ – Pap-Test/Biopsie positiv) könnte womöglich ein fortgeschrittener Dysplasiegrad mit der bereits stattgefundenen Integration des Virusgenoms ins menschliche Genom sein. Laut einer Studie findet die Integration in 5% aller CIN II Dysplasien, 16% aller CIN III Dysplasien und 87% aller invasiven Karzinome statt (68). Während der Integration können viele Abschnitte des viralen Genoms verloren gehen, darunter auch Teile der L1-Region. Da die Zielsequenz der GP 5+/6+ PCR ein Abschnitt innerhalb der L1-Region ist, würde der HPV-Test, trotz der vorhandenen Infektion, negativ ausfallen. Eine weitere Möglichkeit wäre ein nicht repräsentativer Abstrich mit sehr geringer Zell/Viruskonzentration, sodass in der eingesetzten Probe (10 µl von 160 µl DNA Isolat) nicht ausreichend Viruskopien vorliegen, um in der PCR nachgewiesen werden zu können.

4.6 Qualitätssicherung der Luminex-Technologie

Zur Qualitätssicherung der Luminex-Technologie wurde diese zum einen im Rahmen des Methodenäquivalenzversuchs mit dem HC2-Test verglichen. Zum anderen wurde ein Ringversuch durchgeführt, wobei dieselben Proben mittels des gleichen Verfahrens (Luminex-Technologie) in zwei verschiedenen Laboratorien (IMD und GTI-Labor) auf Vorliegen von HPV untersucht wurden.

Der Methodenäquivalenzversuch zeigte die 80%-ge Übereinstimmung der Ergebnisse von Genotypisierung mit Luminex-Technologie und HC2-Test. Es lagen vier Proben mit diskrepanten Ergebnissen vor. In drei Proben wurde bei der Genotypisierung keine LR-HPV-Infektion nachgewiesen. Der HC2-Test war dennoch LR-HPV positiv. Die Sensitivität der GP5+/GP6+ PCR ist unterschiedlich für verschiedene HPV Typen, da die „general primer“ verschieden spezifisch für die verschiedenen HPV Typen sind. Diese ist für LR-HPV Typen deutlich geringer als für die HR-HPV Typen (51). Eine Probe war HPV-negativ bei der Genotypisierung, jedoch HR-HPV-positiv im HC2-Test. Da in die PCR weniger Probenmaterial eingesetzt wird, als in den HC2-Test, kann bei einer niedrigen Viruslast die Ziel-DNA „verpasst“ werden. Eine höhere Konzentration der Proben-DNA könnte hier Abhilfe schaffen. Ein vergleichbares Ergebnis ist unten bei der Diskussion des Ringversuchs dargestellt.

Im Rahmen des Ringversuchs lag bei einer der fünf Proben ein diskrepantes Ergebnis vor. Im GTI-Labor wurde kein HPV nachgewiesen. Durch das IMD wurde jedoch HPV 16 detektiert mit einem niedrigen RLU-Wert, d. h. geringer HPV-16-DNA Menge. Nach der erneuten Bestimmung aus der Probenreserve wurde auch im GTI-Labor HPV 16 nachgewiesen. Da in die PCR nur eine kleine Menge von Probenmaterial eingesetzt wird, kann bei einer niedrigen Viruslast die Ziel-DNA „verpasst“ werden. Bei der Wiederholung liegt sie dann in den 10 µl DNA Probe vor. Eine höhere Konzentration der Proben-DNA könnte eine Lösung dieses Problems sein.

4.7 APTIMA® HPV-Test

Insgesamt 75 Lavage-Abstrich-Paare wurden zusätzlich zum in der Studie angewandten Verfahren mittels APTIMA-HPV-Tests untersucht. Dieser Test beruht auf dem Nachweis von Virus-RNA durch hochsensible Amplifikation. Von den 150

Diskussion

getesteten Proben hatten 127 (84,6%) in beiden Methoden identische Befunde. Das heißt, durch beide Methoden wurde HR-Infektion nachgewiesen bzw. die Proben waren HR-HPV-negativ. Bei den Lavagen wurde etwas höhere Übereinstimmung (86,6%) als bei den Abstrichen (82,6%) beobachtet. Üblicherweise werden die Proben, die mit dem APTIMA HPV-Test untersucht werden, sofort nach der Entnahme im Stabilisierungsmedium fixiert. Das war in der aktuellen Studie nicht möglich. Der APTIMA-Test wurde, je nach Probe, 8 bis 14 Monate nach der Probenentnahme und Asservierung durchgeführt. Für den Test wurden die bei -80°C eingefrorenen Reserveproben verwendet. Wenn man beachtet, dass vor allem Lavagen zum Teil lange Transportwege ohne Kühlung hatten und anschließend bis zu einer Woche bei 4°C gelagert wurden, bevor die Asservierung bei -80°C stattfand, ist es erstaunlich, dass so ein hoher Prozentsatz der Proben mit Übereinstimmung der Ergebnisse vorliegt. RNA wird als sehr labil angesehen, ist aber dennoch in unserer Studie trotz der Versendung bei Raumtemperatur und Fixierung erst nach mehr als einer Woche dennoch gut nachweisbar. Überraschenderweise korrelieren die Ergebnisse beider Methoden bei den Lavagen sogar besser als bei den Abstrichen.

Beim APTIMA-Test erfolgt keine Genotypisierung der detektierten HR-HPV-Typen. Aus diesem Grund konnte nicht überprüft werden, inwieweit der Nachweis von einzelnen HPV-Typen in beiden Methoden korreliert.

20 von 150 (13,3%) Proben wurden mit APTIMA-Test negativ getestet, sind jedoch bei der Genotypisierung positiv ausgefallen. In Anbetracht der nicht optimalen Transportbedingungen und sehr langen Lagerungszeit vor der Messung hatten wir eine eher höhere Zahl solcher falschnegativer Proben erwartet.

Insgesamt drei Proben – zwei Lavagen und ein Abstrich – waren HR-HPV-positiv im APTIMA-Test, hatten jedoch ein negatives Ergebnis in der Luminex-Technologie. Eine der zwei Lavagen und der Abstrich stammten von derselben Probandin aus der Dysplasie-Gruppe. Bei dieser Patientin lag sowohl der zytologische als auch der histologische Befund vor. Der Pap-Test wurde in die Kategorie Pap III d eingestuft. Im Biopsat wurde jedoch eine hochgradige Dysplasie der Zervix (CIN III) diagnostiziert. Es ist bekannt, dass mit fortschreitendem Dysplasiegrad die Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom zunimmt (68). Bei der Integration kann ein großer Teil des viralen Genoms verloren gehen. Ab diesem Zeitpunkt findet die vermehrte Transkription von Regionen, die für Onkoproteine E6 und E7 kodieren, statt (69). Der Genomabschnitt, welcher für

das Strukturprotein L1 kodiert, wird dagegen nicht mehr transkribiert. Möglicherweise lag bei der oben genannten Probandin die HPV-DNA bereits in integrierter Form vor, was in Anbetracht des fortgeschrittenen Dysplasiegrades denkbar wäre. Das würde erklären, warum der APTIMA-Test, in welchem die mRNA der viralen Onkogene E6 und E7 die Zielsequenzen der Nukleinsäuresonden sind, positiv ausgefallen ist. Die Zielsequenz der GP 5+/6+ ist dagegen ein etwa 140-150bp-langer Abschnitt innerhalb der L1-Region vom HPV-Genom. Da diese Region bei der Integration verloren gehen kann, könnte dies erklären, dass man kein PCR-Produkt findet und dadurch keine HPV-DNA nachweist, obwohl eine HPV-Infektion besteht.

5 Literaturverzeichnis

1. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, eds. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. New-York, San Diego: Academic Press, 2000:247-51.
2. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010;401:70-9.
3. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
4. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. Knipe DM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007:Vol 2:2300-54.
5. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005;32:16-24.
6. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006;118:3030-44.
7. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
8. Frisch M, Fenger C, van den Brule AJ, et al. Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. *Cancer Res* 1999;59:753-7.
9. Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM, et al. A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecol Oncol* 2002;84:263-70.

10. Madeleine MM, Daling JR, Carter JJ, et al. Cofactors with human papillomavirus in a population-based study of vulvar cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1516-23.
11. Kurman RJ, Toki T, Schiffman MH. Basaloid and warty carcinomas of the vulva. Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. *Am J Surg Pathol* 1993; 17:133-45.
12. Dillner J, von Krogh G, Horenblas S, Meijer CJ. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000; 205: 189-93.
13. Bezerra AL, Lopes A, Landman G, Alencar GN, Torloni H, Villa LL. Clinicopathologic features and human papillomavirus DNA prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. *Am J Surg Pathol* 2001;25:673-8.
14. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al. Detection and typing of human papillomavirus dna in penile carcinoma. *Am J Pathol* 2001;159:1211-8.
15. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772-83.
16. Gustafsson L, Pontén J, Bergström R, Adami HO. International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening. *Int J Cancer* 1997;71:159-165.
17. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, et al. Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 8. Ausgabe, Berlin 2012;68-71.
18. Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, et al. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 7. Ausgabe, Berlin 2010;60-3.

19. Maaßen V, Pietschmann D. Veränderungen und Tumore der weiblichen Geschlechtsorgane. In: Stauber M, Weyerstahl T, eds. Duale Reihe – Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2007:232-54.
20. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
21. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 2006;116:1167-73.
22. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-8.
23. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991;254:1167-73.
24. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:14-9.
25. Lundberg GD. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA* 1989;262:931-4.
26. Papanicolaou GN. A new procedure for staining vaginal smears. *Science* 1942;95:438-9.
27. Löning T. Dyplasien und Neoplasien des Plattenepithels der Zervix. In: Löning T, Riethdorf L, Dhom G, eds. Pathologie der weiblichen Genitalorgane III. Pathologie des Uterus, der Vagina und Vulva. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2001:257-333.
28. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:12180-4.
29. Ault KA; Future II Study Group. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet*. 2007;369:1861-8.
30. Paavonen J, Naud P, Salmeron J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccines against cervical infection and precancer caused

- by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009;374:301-14.
31. Wheeler CM, Castellsagué X, Garland SM, et al. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol* 2012;13:100-10.
32. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008;26:1-16.
33. Frank W, Konta B, Peters-Engl C. PAP-Test zum Screening auf Zervixkarzinom. Deutsche Agentur für Health Technology Assessment des Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DAHTA@DIMDI). 1. Auflage 2005.
34. Schneider A, Schwarz TF, Hammerschmidt T, Rash RM, Siebert U. Vorgehen und Kosten bei der Abklärung und Behandlung unklarer und abnormaler zytologischer Befunde des Pap-Abstrichs im Rahmen der Krebsfrüherkennungsuntersuchungen. *Geburtsh Frauenheilk* 2007;67:859-65.
35. Friese K, Sitter H, Anton G, et al. Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion und präinvasiver Läsionen des weiblichen Genitale. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen. 2008.
36. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, et al. HPV type-specific risks of high-grade CIN during 4 years of follow-up: a population-based prospective study. *Br J Cancer*. 2007;97:129-32.
37. Bulkmands NWJ, Berkhof J, Rozendaal L, et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet* 2007;370:1764-72.
38. Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, et al. Comparison of Predictors for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Abnormal Smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3033-42.

39. Monsonego J, Bohbot JM, Pollini G, et al. Performance of the Roche AMPLICOR® Human papillomavirus (HPV) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women with abnormal PAP smear. *Gynecologic Oncology* 2005;99:160-8.
40. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and metaanalysis. *Lancet* 2006;367:489-98.
41. Bosch FX, de Sanjose S. Human Papillomavirus and Cervical Cancer—Burden and Assessment of Causality. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2003;31:3-13.
42. Sargent A, Bailey A, Almonte M, et al. Prevalence of type-specific HPV infection by age and grade of cervical cytology: data from the ARTISTIC trial. *British Journal of Cancer* 2008;98:1704-9.
43. Arbyn M, Benoy I, Simoens C, Bogers J, Beutels P, Depuydt C. Prevaccination distribution of human papillomavirus types in women attending at cervical cancer screening in Belgium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:321-30.
44. Iftner T, Eberle S, Iftner A, et al. 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;82:1928-39.
45. Petry K-U, Menton S, Menton M, et al. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *British Journal of Cancer* 2003;88:1570-7.
46. Speich N, Schmitt C, Bollmann R, Bollmann M. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the west German area. *Journal of Medical Microbiology* 2004;53:125-8.
47. Schneider A, Hoyer H, Lotz B, et al. Screening for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer* 2000;89:529-34.

48. Koch J, Kirschner W, Schäfer A. Bestimmung der Prävalenz genitaler HPV- und Chlamydia-trachomatis-Infektionen in einem repräsentativen Querschnitt der weiblichen Normalbevölkerung in Berlin. RKI InfFo 1997;2:1-7.
49. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. J Gen Virol 1990;71:173-81.
50. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. J. Gen. Virol 1995;76:1057-62.
51. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJF, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. Journal of Clinical Microbiology 2006;44:504-12.
52. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. Journal of Clinical Microbiology 2008;46:1050-59.
53. Hybrid Capture 2 Technology, Qiagen Website. (Accessed March 29, 2013, at <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/HPV-Testing/digene-HC2-HPV-DNA-Test#productdetails>)
54. Gen-Probe APTIMA HPV Package Insert. (Accessed at February 14, 2013, at <http://www.gen-probe.com/pdfs/pi/502170-EN-RevA.pdf>.)
55. Cohen, J. A coefficient for agreement for nominal scales. Education and Psychological Measurement 1960;20:37-46.
56. Brennan P, Silman A. Statistical methods for assessing observer variability in clinical measures. BMJ 1992;304:1491-4.
57. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. Int J Cancer. 2006;118:1481-95.

58. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:1060-9.
59. Vaccarella S, Franceschi S, Herrero R, et al. Sexual behavior, condom use, and human papillomavirus: pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:326-33.
60. Vaccarella S, Herrero R, Snijders PJF, et al. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *International Journal of Epidemiology* 2008;37:536-46.
61. Brink AATP, Meijer CJLM, Wiegerinck MAHM, et al. High concordance of results of testing for human papillomavirus in cervicovaginal samples collected by two methods, with comparison of a novel self-sampling device to a conventional endocervical brush. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:2518-23.
62. Evans MF, Adamson CSC, Papillo JL, St. John TL, Leiman G, Cooper K. Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer* 2006;106:1054-64.
63. Gonzalez-Bosquet E, Almagro MM, Mora I, Suñol M, Callejo J, Laila JM. Prevalence of human papilloma virus infection of the uterine cervix in women with abnormal cervical cytology. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006;27:135-8.
64. Kjær SK, Breugelmans G, Munk C, Junge J, Watson M, Iftner T. Population-based prevalence, type- and age-specific distribution of HPV in women before introduction of an HPV-vaccination program in Denmark. *Int. J. Cancer* 2008;123:1864-70.
65. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, et. al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *The Journal of Infectious Diseases* 2005;191:1796-807.

66. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009;124:516-20.
67. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*. 2006;119:1095-101.
68. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Research* 1999;59:6132-6.
69. Schwarz E, Freese UK, Gissman L, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111-4.

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
Abb.	Abbildung
Abs.	Absolutiert
ASC-H	atypical squamous cells – cannot exclude HSIL
ASC-US	atypical squamous cells of undetermined significance
β	Beta
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca	Kalzium
ca.	Circa
CBF	Charité Campus Benjamin Franklin
CCM	Charité Campus Mitte
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
Cis	Carcinoma in situ
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-Zap	DNA-abbauende Lösung
Dr. med.	Doctor medicinae
E	Early
E1, E2, E4, E5, E6, E7	virale Onkoproteine
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOS	erweiterte Oberschule
etc.	et cetera
EUR	Euro
evtl.	eventuell
FIGO-Klassifikation	von der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique vorgeschlagenes System zur Stadieneinteilung gynäkologischer Tumoren
FUTURE	Studie zur Wirksamkeit und Sicherheit von Gardasil
GbR	Gesellschaft bürgerlichen Rechts
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GP	general primer
GP5+/6+	Primerset für PCR
GP6+bio	GP6+ mit Biotin gekoppelt
GSK	GlaxoSmithKline
GTI-Labor	Labor für gynäkologische Tumorummunologie
HC2	Hybrid Capture II
HPV	humane Papillomviren

Abkürzungsverzeichnis

HR	High-risk
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesion
ICTV	International Committee of the Taxonomy of Viruses
IMD	Institut für medizinische Diagnostik
J	Jahre
κ	Kappa, Interrate-Reliabilität
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
L	late
L1	major capsid protein, virales Strukturprotein 1
L2	minor capsid protein, virales Strukturprotein 2
LCR	long control region
LEEP	loop electrical excision procedure
LR	Low-risk
LSIL	low-grade squamous intraepithelial lesion
M	Molar, Mol/Liter
max.	Maximal
MFI	Median der Fluoreszenz-Intensität
min	Minute
mind.	Mindestens
Mg	Magnesium
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar, Millimol/Liter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
MY09/11	Primerset für PCR
n	Fallzahl in einer statistischen Gruppe
neg.	negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NTP	Nukleosidtriphosphat
NUM	Nuklearmedizin
ORF	open reading frame
Pap-Abstrich	Zervixabstrich nach Papanicolaou
PATRICIA	Studie zur Effektivität und kreuzprotektiven Eigenschaft von Cervarix
PBS	phosphate buffered saline
p chi ²	Pearson Chi-Quadrat-Test
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

PCR-EIA	PCR-Enzymimmunoassay
PD	Privatdozent
pH	potentia hydrogenii
PLZ	Postleitzahl
pos.	positiv
%	Prozent
PV	Papillomviren
®	registered trademark
RKI	Robert Koch-Institut
RLB	reverse line blotting
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
s. o.	siehe oben
SOP	standard operating procedure
SPF10	Primerset für PCR
Streptavidin-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	häufig verwendete Pufferlösung in der molekularen Biologie bestehend aus Tris und EDTA
TK	Tupferkontrolle
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
TNM-Klassifikation	Facettenklassifikation zum Staging von Tumorerkrankungen
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-Wasserstoffchlorid
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIN	vulväre intraepitheliale Neoplasie
VLP	virus-like particle
vs.	versus
xMAP	Multianalyt Profiling
z. B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation von genital-mukosalen HPV (3).	5
Tab. 2: Münchener Nomenklatur II und Bethesda Klassifikation (modifiziert nach 27)..	14
Tab. 3: Ergebnisse der Studien FUTURE II und PATRICIA bezüglich der Wirksamkeit der Impfstoffe Gardasil und Cervarix.	16
Tab. 4: Charakteristika der Studien zur HPV-Prävalenz in Deutschland.	20
Tab. 5: Übereinstimmung der Ergebnisse Lavage vs. Abstrich in der gesamten Studienpopulation, in der Dysplasie-Gruppe und in der Screening-Gruppe für alle HPV-Typen.	36
Tab. 6: Übereinstimmung der Ergebnisse Lavage vs. Abstrich in der gesamten Studienpopulation, in der Dysplasie-Gruppe und in der Screening-Gruppe für HR-HPV-Typen.	37
Tab. 7: Übereinstimmung der Ergebnisse Lavage vs. Abstrich in der gesamten Studienpopulation, in der Dysplasie-Gruppe und in der Screening-Gruppe für HPV 16.	38
Tab. 8: Übereinstimmung der Ergebnisse Lavage vs. Abstrich in der gesamten Studienpopulation, in der Dysplasie-Gruppe und in der Screening-Gruppe für LR-HPV-Typen.	39
Tab. 9: Häufigkeit der HPV-Typen in den selbstentnommenen zervikovaginalen Lavagen und in den zervikalen Abstrichen, angegeben in Anzahl der Proben mit dem detektierten HPV-Typ.	43
Tab. 10: Häufigkeit der HPV-Genotypen in der Studienpopulation und in den Subgruppen.	44
Tab. 11: Zusammenhang von Rauchverhalten und HPV-Infektion in der gesamten Studienpopulation, Dysplasie-Gruppe und Screening-Gruppe.	47
Tab. 12: Einfluss der Anzahl der Sexualpartner auf HPV-Infektion in Dysplasie-Gruppe und Screening-Gruppe.	49
Tab. 13: Korrelation von HPV-Befunden mit den zytologischen und histologischen Befunden in der gesamten Studienpopulation, alle HPV-Typen und HR-HPV-Typen. ...	51
Tab. 14: APTIMA® HPV-Test vs. Luminex-Genotypisierung. Nur HR-HPV-Typen.	53

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Elektronmikroskopisches Bild von PV (4).....	6
Abb. 2: Struktur des HPV-Genoms am Beispiel von HPV 16 (modifiziert nach 4).....	7
Abb. 3: HPV-Beteiligung bei der Karzinogenese weltweit im Jahr 2002 (6).	8
Abb. 4: Altersspezifische Erkrankungsraten in Deutschland für 1980, 1990 und 2006, Fälle pro 100.000 Frauen (18).....	10
Abb. 5: Entwicklung der HPV-Infektion (aus 6).....	12
Abb. 6: Delphi Bioscience B.V. Selbstabnahmegerät.....	25
Abb. 7: Bürste zum Abstrich.....	26
Abb. 8: Verteilung der Studienteilnehmerinnen.	35
Abb. 9: HPV-Prävalenz in der ganzen Studienpopulation und Studiensubgruppen bezogen auf alle HPV-Typen, HR-HPV-Typen, HPV-16 und LR-HPV-Typen.	41
Abb. 10: Häufigkeit der HPV-Infektion (in %) in den Lavagen und in den Abstrichen in den verschiedenen Altersgruppen der Studienpopulation.	45
Abb. 11: Häufigkeit der Mischinfektionen (in %) bei HPV-positiven Frauen in den Lavagen und in den Abstrichen in den verschiedenen Altersgruppen der Studienpopulation.....	46
Abb. 12: Rauchverhalten in der gesamten Studienpopulation und in den Studiensubgruppen.	47
Abb. 13: Anzahl der Sexualpartner in der Studienpopulation (n=181).....	48
Abb. 14: Zytologische und histologische Befunde in der gesamten Studienpopulation und in den Studiensubgruppen.....	50

Anhang

Patienteninformation, Version 18.12.2008

ROBERT KOCH INSTITUT



Patienteninformation zum Pretest zu einer HPV-Prävalenzstudie bei 20- bis 30-jährigen Frauen in Deutschland

Sehr geehrte Studienteilnehmerin,

das Robert Koch-Institut (RKI) führt eine Studie zum Vorkommen (Prävalenz) des Humanen Papillomavirus (HPV) bei jungen Frauen zwischen 20 und 30 Jahren durch. Dabei sollen Proben untersucht werden, die die Studienteilnehmerinnen selbstständig zuhause gewonnen haben. Zur Probengewinnung wird ein Selbstabnahme-Set verschickt, mit dem man über eine Scheidenspülung Flüssigkeit auffangen kann. Diese Spülflüssigkeit kann auf das Vorliegen von HPV untersucht werden. Das Robert Koch Institut ist eine Bundesoberbehörde, die direkt dem Bundesministerium für Gesundheit untergeordnet ist. Die Studie wird federführend von Dr. Yvonne Deleré und Dr. Dorothea Matysiak-Klose vom Fachgebiet „Impfprävention“ des Robert Koch-Institutes durchgeführt. Kooperationspartner sind Dr. Ingke Hagemann, Kiel und PD Dr. Andreas Kaufmann, Gynäkologische Tumorummunologie, Charité.

Warum möchten wir diese wissenschaftliche Studie durchführen?

Infektionen mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) sind sehr häufig. Beinahe jede Frau macht im Lauf ihres Lebens eine HPV-Infektion durch. Die Viren werden am häufigsten durch Geschlechtsverkehr übertragen und können Zellen des Gebärmutterhalses infizieren. Normalerweise kann der Körper die Viren nach ungefähr 6 Monaten erfolgreich bekämpfen. In seltenen Fällen wird die Infektion jedoch chronisch, und es können sich nach einer längeren Zeit (Monate bis Jahre) Veränderungen an den Zellen des Gebärmutterhalses entwickeln. Diese Veränderungen können bösartig werden und zum Gebärmutterhalskrebs führen. In den Früherkennungsuntersuchungen beim Frauenarzt wird nach diesen Zellen gesucht. Frühzeitig erkannt können Veränderungen erfolgreich behandelt werden. HPV gilt als eine wesentliche Ursache für die Entstehung von Zellveränderungen und Krebsgeschwüren am Gebärmutterhals.

Wir möchten mit dieser Untersuchung herausfinden, wie viele Frauen in Ihrer Altersgruppe zwischen 20 und 30 zum jetzigen Zeitpunkt mit HPV infiziert sind und welche Faktoren für die Infektion eine Rolle spielen können. Es gibt derzeit keine Daten aus Deutschland dazu. Diese sind aber von großer Bedeutung, um zum Beispiel die Wirksamkeit einer Impfung gegen HPV in der Bevölkerung bestimmen zu können.

Wie wird die Untersuchung vor sich gehen?

Ihre Teilnahme ist freiwillig. Sie haben einen Termin bei Ihrer Frauenärztin in Kiel oder in der Ambulanz der Charité, Berlin vereinbart. Tage bevor Sie diesen Termin wahrnehmen, können Sie bereits zuhause ein besonderes Verfahren zur Nachweismöglichkeit eines HPV-Virus selbst bei sich anwenden. Eine Gebrauchsinformation zur Selbstabnahme einer Untersuchungsprobe über eine Scheidenspülung und das Selbstabnahme-Set liegen diesem Päckchen bei. Die von Ihnen gewonnene Untersuchungs-Probe wird nach Anleitung verpackt und in dem beiliegenden Freiumschlag an das Robert Koch-Institut zurückgeschickt. Wir werden das Probenröhrchen mit der Untersuchungsprobe an das kooperierende Labor in der Charité weiterleiten. Dort wird dann ein HPV-Test durchgeführt. Über das Testergebnis werden Sie durch Ihre Frauenärztin/Ihren Frauenarzt informiert und beraten.

Im Rahmen Ihres Termins zur Vorsorgeuntersuchung wird ebenfalls eine Untersuchung auf HPV durchgeführt. Diese Untersuchung gehört nicht zum Standard der Früherkennungsuntersuchung, sondern wird nur für diese Studie durchgeführt. D.h. die von Ihnen gewonnene Untersuchungsprobe und der Abstrich vom Frauenarzt werden jeweils auf HPV untersucht. Wir

Patienteninformation, Version 18.12.2008

möchten auf diese Art herausfinden, ob die Selbstabnahme-Sets, die in Holland bereits über 25.000 Frauen genutzt haben, auch in Deutschland gute Testergebnisse liefern. Verletzungen sind durch die Anwendung des Selbstabnahme-Sets in Holland bislang nicht aufgetreten.

Dem Test liegt ein Fragebogen bei. Wir bitten Sie sehr um ein Ausfüllen des Fragebogens. Die Angaben sind wichtig, um die Testergebnisse interpretieren zu können. Die teilweise sehr privaten Fragen werden zu Ihrer Sicherheit sofort verschlüsselt und sind in verschlüsselter Form nur Mitarbeitern des Studienzentrums des Robert Koch-Institutes zugänglich.

Wir bitten Sie auch um die Durchführung einer Blutprobe. Diese Blutprobe wird auf Antikörper gegen HPV untersucht.

Welche Vorteile bringt Ihnen die Teilnahme an dieser Studie?

Normalerweise gehört ein HPV-Test nicht zum Standard einer Früherkennungsuntersuchung beim Frauenarzt. Da sich aber nach aktuellem Wissensstand kein Gebärmutterhalskrebs ohne eine HPV-Infektion entwickelt, könnte ein HPV-Test dazu beitragen, ein mögliches Erkrankungsrisiko an Gebärmutterhalskrebs besser einzuschätzen. Wenn bei einer Frau keine HPV-Infektion nachzuweisen ist, besteht ein sehr geringes Risiko, in den nächsten 5 Jahren zu erkranken. Wenn eine HPV-Infektion nachzuweisen ist, kann Ihre Frauenärztin/Ihr Frauenarzt Sie noch ausführlicher beraten und Ihnen das Wahrnehmen einer jährlichen Kontrolluntersuchung empfehlen.

Was müssen Sie nun tun, wenn Sie teilnehmen möchten?

Wir bitten Sie, zuerst die Gebrauchsinformation des Selbstabnahme-Sets sorgfältig zu lesen. Wenn Sie mit einer Teilnahme einverstanden sind, bitten wir um eine Unterschrift auf der Einwilligungserklärung mit dem Zusatz „Selbstabnahme“. Anschließend können Sie die Selbstabnahme zuhause in ruhiger Atmosphäre durchführen. Die aufgefangene Spülprobe wird nach Vorgabe in der Gebrauchsinformation in das Probenröhrchen umgefüllt. Das Probenröhrchen wird mit dem kleinen Vlies ummantelt und in die beiliegende Plastiktüte gelegt. Die Plastiktüte muss zugeklebt werden. Bitte füllen Sie dann den Fragebogen aus. Der ausgefüllte Fragebogen, die unterschriebene Einwilligungserklärung „Selbstabnahme“ und die zugeklebte Plastiktüte mit dem Probenröhrchen legen Sie bitte in den braunen Luftpolster-Freiumschiel. Bitte kleben Sie den braunen Luftpolster-Freiumschiel zu. Der braune Luftpolster-Umschiel ist adressiert und frankiert. Sie müssen ihn nur innerhalb von 24 Stunden nach der Durchführung der Selbstabnahme in einen Briefkasten stecken. Wenn Sie auch einverstanden sind, eine Blutprobe durchführen zu lassen, unterschreiben Sie bitte den zweiten Einwilligungsbogen mit dem Zusatz „Blutprobe“. Bringen sie diese zweite Einwilligungserklärung mit zum Termin bei Ihrer Frauenärztin/Ihrem Frauenarzt. Dort wird Ihnen dann eine Blutprobe entnommen.

Wenn Sie Fragen zu dieser Studie haben oder Probleme mit dem Selbstabnahme-Set auftreten, können Sie von Montag-Freitag Kontakt zu den Studienleiterinnen im Robert Koch-Institut aufnehmen:

Dr. med. Yvonne Deleré, Email delerey@rki.de, Tel.: 030 – 18 754 3410

Dr. med. Dorothea Matysiak-Klose, Email Matysiak-klosed@rki.de, Tel.: 030 – 18 754 3414

Wir würden uns sehr freuen, wenn Sie an der Studie teilnehmen!

Das Studien-Team

Study Code: Pretest HPV-Prävalenz
Version vom: 11.11.08

ROBERT KOCH INSTITUT



Einwilligungserklärung: „Selbstabnahme“

Titel der Studie: Pretest zu einer HPV-Prävalenzstudie bei 20- bis 30-jährigen Frauen in Deutschland

Hiermit erkläre ich _____
(Vorname, Name)

(Geburtsdatum)

(Straße, Hausnummer)

(PLZ, Ort)

dass ich schriftlich über das Wesen, die Bedeutung, Tragweite und Risiken der oben genannten wissenschaftlichen Untersuchung informiert wurde und ausreichend Gelegenheit hatte, meine Fragen hierzu mit einer Mitarbeiterin des Robert Koch-Institutes oder meinem Frauenarzt zu klären.

Ich habe insbesondere die mir mit dieser Einwilligungserklärung vorgelegte Patienteninformation in der Fassung vom 11.11.2008 verstanden und eine Ausfertigung derselben erhalten. Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen kann. Im Fall eines Widerrufs werden die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten gelöscht.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die im Fragebogen erhobenen Daten ohne Namensnennung (pseudonymisiert) zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung am Robert Koch-Institut gespeichert werden. Ich erkläre mich ferner damit einverstanden, dass meine personenbezogenen Daten zusammen mit dem Identifikationscode in einer separaten Datei, die nur den Studienärztinnen zugänglich ist, gespeichert werden, um mir das Ergebnis der Laboruntersuchung zum Humanen Papillomavirus mitteilen zu können.

Darüber hinaus bin ich mit der Verschlüsselung und Untersuchung sowie verschlüsselten bzw. pseudonymisierten Lagerung meiner im Rahmen dieser Studie gewonnenen Proben für den Zweck der Studie einverstanden.

Ich bin bereit, an der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der o.g. Studie teilzunehmen.

_____, den _____

(Unterschrift der Versuchsteilnehmerin)

Fragebogen zur HPV-Studie

Sehr geehrte Teilnehmerin,

vielen Dank, dass Sie an unserer Studie teilnehmen. Bitte beantworten Sie die folgenden Fragen. Für jede Frage ist eine Antwort zulässig. Wir garantieren Ihnen einen vertraulichen Umgang mit Ihren Angaben. Es erfolgt nur eine pseudonymisierte Auswertung. Bitte schicken sie den Fragebogen zusammen mit der von Ihnen zu Hause gewonnenen Probe so schnell wie möglich im frankierten Freiumschlag zurück an das Robert Koch-Institut, Berlin.

Vielen Dank!

Datum:

Ich nehme an der Untersuchung teil:

- ₁ ja
₂ nein

⇒ wenn nein, geben Sie bitte hier Ihre Gründe an (die weiteren Fragen müssen Sie nicht beantworten):

Teil I

Frage 1:

Wann sind Sie geboren (z.B. Mai 1970 = 05 19 70)?

19
Monat Jahr

Frage 2:

Welche Staatangehörigkeit haben Sie?

- ₁ Deutsch
₂ Andere und zwar _____

Frage 3:

In welchem Land sind Sie geboren?

- ₁ Deutschland
₂ In einem anderen Land und zwar _____

Frage 4:

Welchen Schulabschluss haben Sie?

- ₁ Hauptschulabschluss / Volksschulabschluss
₂ Realschulabschluss (Mittlere Reife)
₃ Abschluss Polytechnische Oberschule 10. Klasse
₄ Fachhochschulreife (Abschluss einer Fachoberschule)
₅ Abitur, allgemeine oder fachgebundene Hochschulreife (Gymnasium bzw. EOS)
₆ Anderen Schulabschluss
₇ Schule beendet ohne Abschluss
₈ Noch keinen Schulabschluss

Frage 5:

In welcher beruflichen Stellung sind Sie hauptsächlich derzeit bzw. waren Sie zuletzt beschäftigt?

- ₁ Ungelehrte Arbeiterin
- ₂ Angelehrte Arbeiterin, Facharbeiterin, Landwirtin
- ₃ Beamtin (einfacher Dienst), Vorarbeiterin, Meisterin, Angestellte mit einfachen Tätigkeiten
- ₄ Beamtin (mittlerer Dienst), Angestellte mit qualifizierter Tätigkeit
- ₅ Selbständige mit max. 9 Angestellten
- ₆ Beamtin (gehobener Dienst), Angestellte mit hochqualifizierter Tätigkeit oder Leitung, Akademikerin
- ₇ Beamtin (höherer Dienst), Angestellte mit Führungsaufgaben, Selbständige mit mind. 10 Angestellten

Frage 6:

Wie hoch ist das monatliche Haushaltseinkommen, d.h. das Nettoeinkommen, das Sie (alle im Haushalt lebenden Personen) nach Abzug der Steuern und Sozialabgaben haben?

- ₁ Unter 1000 EUR
- ₂ 1000 bis unter 1500 EUR
- ₃ 1500 bis unter 2000 EUR
- ₄ 2000 bis unter 2500 EUR
- ₅ 2500 bis unter 3000 EUR
- ₆ 3500 bis unter 4000 EUR
- ₇ 4000 und mehr

Frage 7:

Rauchen Sie?

- ₁ Ja → Wie viele Zigaretten rauchen Sie zurzeit durchschnittlich am Tag? _____
- ₂ Nein

Frage 8:

Nehmen Sie regelmäßig Medikamente ein?

- ₁ Nein, ich nehme keine Medikamente ein
- ₂ Ja, nur die Pille
- ₃ Ja, die Pille und _____
- ₄ Ja, nicht die Pille, aber _____

Frage 9:

Waren Sie schon einmal schwer erkrankt (z.B. an einer Krebserkrankung) oder haben Sie eine chronische Erkrankung (z.B. Diabetes mellitus, Allergie)?

- ₁ Ja Wenn „Ja“, welche: _____
- ₂ Nein
- ₉ Keine Angabe

Frage 10:

Wurden Sie bereits wegen einer Veränderung am Gebärmutterhals von Ihrem Frauenarzt behandelt (z.B. auffälliger Krebsvorsorge-Abstrich oder andere Veränderungen)?

- ₁ Ja Wenn „Ja“, welche Veränderung: PAP _____ ₈ weiß nicht
₂ Ja Wenn „Ja“, welche andere Veränderung: _____ ₈ weiß nicht
Wenn „Ja“, welche Therapie: _____ ₈ weiß nicht
₃ Nein
₈ Weiß nicht

Frage 11:

Wurden Sie schon einmal wegen Genitalwarzen (Feigwarzen, Condylomata accuminata) behandelt?

- ₁ Ja
₂ Nein
₈ Weiß nicht

Nun werden die Fragen noch persönlicher. Wir versichern Ihnen, dass wir alle diese Aussagen anonym speichern und auswerten!

Frage 12:

Leben Sie zurzeit in einer festen sexuellen Partnerschaft?

- ₁ Ja
₂ Nein

Frage 13:

Wie alt waren Sie beim „ersten Mal“ (Alter des ersten Geschlechtsverkehrs)?

- ₁ jünger als 14 Jahre
₂ 14 Jahre
₃ 15 Jahre
₄ 16 Jahre
₅ 17 Jahre
₆ älter als 17 Jahre

Frage 14:

Wie viele Sexualpartner hatten Sie in Ihrem ganzen Leben?

- davon waren männlich und weiblich

Frage 15:

Welche Verhütungsart wenden Sie an?

- ₁ keine
- ₂ Pille
- ₃ Hormonring (z.B. Nuva-Ring)
- ₄ Kondom
- ₅ Spirale
- ₆ andere, z.B. _____

Frage 16:

Wann benutzen Sie ein Kondom?

a) feste Partnerschaft

b) „one-night stand“ oder Affäre

- | | | |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Immer | <input type="checkbox"/> ₁ | <input type="checkbox"/> ₁ |
| Häufig | <input type="checkbox"/> ₂ | <input type="checkbox"/> ₂ |
| Gelegentlich | <input type="checkbox"/> ₃ | <input type="checkbox"/> ₃ |
| Selten | <input type="checkbox"/> ₄ | <input type="checkbox"/> ₄ |
| Nie | <input type="checkbox"/> ₅ | <input type="checkbox"/> ₅ |

Frage 17:

Haben Sie schon einmal einen HPV Test durchführen lassen?

- ₁ Ja
- ₂ Nein
- ₈ weiß nicht

Frage 18:

Wurden Sie gegen eine HPV-Infektion geimpft?

- ₁ Ja, mit folgendem Impfstoff: Gardasil® oder Cervarix®
→ Wenn „Ja“, wann (bitte Angabe mit Monat/Jahr): 20
Monat Jahr
→ Wenn „Ja“, wie oft? 1x 2x 3x
- ₂ Nein
- ₈ weiß nicht

Vielen Dank für Ihre Angaben.

Jetzt folgen auf einer vierten Seite noch Fragen zu dem Umgang mit dem Selbstabnahmetest und dem Fragebogen.

Bitte nehmen Sie sich noch ein paar Minuten Zeit für die Beantwortung!

Teil II

Frage 19:

War der Umgang mit dem Selbstabnahme-Set eher einfach oder fanden Sie die Anwendung schwierig (Frage zur Technik)?

Bitte machen Sie ein Kreuz auf der Linie um auszudrücken, wie Sie die Anwendung empfunden haben:



Sehr einfach



Sehr schwierig

Frage 20:

Wie haben Sie die Anwendung des Selbstabnahme-Sets empfunden (Frage zum Gefühl)?

Bitte machen Sie ein Kreuz auf der Linie um auszudrücken, ob für Sie die Anwendung komfortabel oder eher unangenehm war:



Komfortabel



Unangenehm

Frage 21:

Wenn das Ergebnis des HPV-Tests aus der Selbstabnahme genauso zuverlässig ist, wie eine Untersuchung beim Frauenarzt, welche Methode der Probengewinnung würden Sie bevorzugen?

- ₁ Probe durch eine Selbstabnahme
- ₂ Abstrich durch einen Frauenarzt
- ₈ weiß nicht

Frage 22:

Wie haben Sie die Fragen des ersten Teils des Fragebogens empfunden?

Bitte machen Sie ein Kreuz auf der Linie um auszudrücken, ob die Beantwortung der Fragen für Sie dem Thema entsprechend angemessen oder unangenehm war:



Angemessen



Unangenehm

Frage 23:

Waren die Fragen des ersten Teils verständlich?

Bitte machen Sie ein Kreuz auf der Linie, ob die Fragen einfach oder schwierig zu beantworten waren:



Sehr einfach



Sehr schwierig

Vielen Dank für Ihre Teilnahme!



pantarhei
screener

ROBERT KOCH INSTITUT



Gebrauchsinformation

Pantarhei® Screener

Selbstabnahme-Set zur HPV-Bestimmung

Bitte vor Anwendung zuerst
diese Gebrauchsinformation **sorgfältig** lesen.

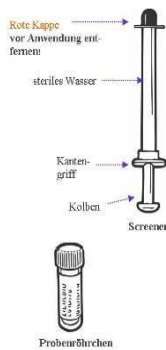
Einleitung

Das Robert Koch-Institut führt eine Studie zum Vorkommen von Infektionen mit Humanen Papillomaviren (HPV) durch. Viele Frauen werden in ihrem Leben mit HPV infiziert, ohne dass diese Infektion bemerkt wird. In seltenen Fällen können Infektionen mit HPV Zellveränderungen am Gebärmutterhals hervorrufen, die bösartig werden können. Um solche Veränderungen frühzeitig zu erkennen, wird allen Frauen in Deutschland ab einem Alter von 20 Jahren eine regelmäßige Teilnahme an den Krebsvorsorgeuntersuchungen beim Frauenarzt empfohlen.

Es wird derzeit diskutiert, ob ein regelmäßiger HPV-Test als Ergänzung zur Vorsorgeuntersuchung sinnvoll sein kann, um Frauen besser vor Gebärmutterhalskrebs zu schützen. Zurzeit kann dies niemand beantworten. Es ist auch nicht bekannt, wie viele Frauen in Deutschland mit HPV infiziert sind.

Aus diesem Grund bitten wir um Ihre Mithilfe. Mit dem Ihnen zugeschickten Selbstabnahme-Set, dem *Pantahel® Screener*, können Sie zuhause eine Probe gewinnen, die auf HPV untersucht werden kann. Die Selbstabnahme funktioniert schnell, ist einfach und schmerzlos. Man führt das Abnahme (den *Screener*) vorsichtig vaginal ein, spült eine geringe Menge steriles Wasser in die Scheide und fängt das zurücklaufende Wasser mit demselben *Screener* wieder auf.

Bitte benutzen Sie den *Screener* nicht, wenn Sie schwanger sind, wenn Sie vor kurzem ein Kind geboren haben (vor weniger als 30 Tagen) oder während Ihrer Regelblutung. Wenn Sie ein Produkt verwenden, das über die Scheide eingeführt wird (*Spermizide*, *Vaginalcremes*, *Vaginalzäpfchen*, etc.), pausieren Sie es bitte für zwei Tage, bevor Sie den *Screener* verwenden.



Schritt 1 Vorbereitung

Das Robert Koch-Institut hat Ihnen ein Abnahme-Set mit einem sterilisierten *Screener* und ein Probenröhrchen zugeschickt.

Waschen Sie bitte vor Gebrauch Ihre Hände und entfernen Sie den Deckel des Probenröhrchens. Öffnen Sie die Verpackung mit dem sterilen *Screener*. Das Instrument hat zur einfacheren Anwendung eine gewisse Länge, aber man muss das Abnahmegerät nur maximal bis zur Hälfte des Schafts in die Scheide einführen.

Legen Sie sich am besten auf ein Handtuch (für den Fall, dass etwas Flüssigkeit vorbeifließt) mit einem Kissen unter dem Gesäß. Ziehen Sie die Knie so an, dass die Beine schulterbreit auseinander stehen. Nehmen Sie den *Screener*, halten Sie ihn mit dem Kopf nach oben und entfernen Sie die rote Kappe. Eventuell sind wenige Wassertropfen auf dem Abnahmegerät zu sehen.



Schritt 2 Der Test

Halten Sie den *Screener* nahe des Kanten-griffs mit einer Hand und führen Sie ihn mit der runden Spitze vorsichtig so tief wie möglich in die Scheide ein, bis Sie einen Widerstand bemerken (ähnlich wie bei einem Tampon).

Drücken Sie den Kolben komplett in einer Bewegung ein. Halten Sie den Kolben in dieser Position und zählen Sie bis 5. Dann lassen Sie den Kolben zurück gleiten, damit die Flüssigkeit wieder aufgefangen werden kann. Die Flüssigkeit wird automatisch in den *Screener* aufgesogen.

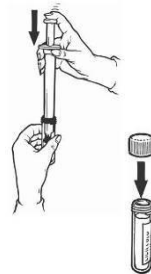
Ziehen Sie den *Screener* ruhig mit drehenden Bewegungen aus der Scheide.

Kleine Mengen Wasser werden wahrscheinlich während der Abnahme aus der Scheide laufen. Das ist normal und sollte Sie nicht beunruhigen. Es bleibt ausreichend Flüssigkeit für die Durchführung des HPV-Tests übrig. Für den seltenen Fall, dass nicht genügend Material gewonnen werden konnte, wird das Robert Koch-Institut sich mit Ihnen in Verbindung setzen.

Schritt 3 Abschluss

Setzen Sie sich auf. Halten Sie das geöffnete Probenröhrchen fest mit einer Hand. Halten Sie die Spitze des *Screener* einfach auf das Probenröhrchen. Entleeren Sie den *Screener* durch Herunterdrücken des Kolbens. Die Flüssigkeit mit dem gewonnenen Material wird vom *Screener* in das Probenröhrchen fließen. Verschieben Sie das Probenröhrchen mit dem Schraubverschluss fest.

Trocknen Sie sich selbst mit dem Handtuch ab. Ziehen Sie sich wieder an. Der *Screener* kann weggeworfen werden. Er ist für eine einmalige Benutzung vorgesehen. Bitte waschen Sie abschließend erneut Ihre Hände.



Schritt 4

Verpackung

Ummanteln Sie bitte das Probenröhrchen mit dem Verpackungsfließ und stecken es in die Plastiktüte. Die verschlossene Plastiktüte legen Sie bitte gemeinsam mit dem ausgefüllten Fragebogen und der unterschriebenen Einwilligungserklärung in das Freikuvert. Das zugeklebte Kuvert schicken Sie bitte an das Robert Koch-Institut. Sie können das Kuvert einfach in den nächsten Briefkasten stecken. Eine Briefmarke muss nicht mehr aufgeklebt werden.

BITTE SENDEN SIE DAS KUVERT INNERHALB VON 24 STUNDEN NACH DURCHFÜHRUNG DES TESTES AN DAS ROBERT KOCH-INSTITUT ZURÜCK. DANN KANN EINE GUTE QUALITÄT DER TESTERGEBNISSE GEWÄHRLEISTET WERDEN.

Sie erhalten eine schriftliche Benachrichtigung über Ihr Testergebnis ca. 4 Wochen nach Ankunft im Labor.

Für Rückfragen steht Ihnen gern das Studien-Team (s.u.) zur Verfügung.

Studien-Team am Robert Koch-Institut:

Dr. med. Yvonne Deléré

Email: delerey@rki.de

Dr. med. Dorothea Matysiak-Klose

Email: matysiak-klosed@rki.de

.....
Robert Koch-Institut

Seestr. 10

13353 Berlin

Tel.: 030—18 754 0

Kooperationspartner Labor:

PD Dr. A.M. Kaufmann

Gynäkologische Tumورimmunologie Charité

Hersteller des Selbstabnahme-Sets:

Pantarhei Devices

Boslaan 11

3701 CH Zeist

The Netherlands

info@pantarhei-devices.com

www.pantarheiscreeener.com

CE 0344

© Pantarhei Devices BV Zeist, September 2008

Haftungsausschluss:

Pantarhei Devices kann keine Haftung übernehmen, wenn der Selbstabnahme-Test oder das Proberöhrchen inkorrekt oder fahrlässig benutzt werden. Wenn nach dem Lesen der Gebrauchsinformation noch Fragen oder Zweifel an dem Gebrauch des Produktes bestehen, wenden Sie sich bitte an das Studien-Team im Robert Koch-Institut vor der Anwendung des Selbstabnahme-Tests.

Anhang

Charité CBF

Gynäkologische Tumorimmunologie

PD Dr. A. M. Kaufmann

Dokument Typ: Standard Protokoll	Dokument Titel: Konservierung von HPV-Abstrichen	Ersteller: Dr. E. Glastetter
Kennung:: SOP Nr. 1	Version:	Datum: 08.01.09

Ziel der Methode:

Zellmaterial vom Tupfer in Suspension bringen und sachgerecht lagern

Durchführung:

Die Proben werden bis zur Aufarbeitung bei -20°C im S1-Labor GS3 Fach 4 gelagert. Die Aufarbeitung findet im großen Raum der Nuklearmedizin (NUM) statt.

Es wird ein frischer DNA-freier gelber Schutzkittel getragen und blaue Überschuhe angezogen. Die Handschuhe sollen über dem Ärmel abschließen.

Ein Polytrap 295 PE auf Arbeitsplatz legen

1. Es werden 2 ml PBS/0,005 % Thimerosal (mit 2ml Einmalpipetten) in die originalen Probenröhrchen pipettiert (Lagerung bei 4°C). TK=Tupferkontrolle nicht vergessen- als Leerprobe mitlaufen lassen (im Unterschrank beim Thermoblock)
2. Die Röhrchen wieder verschließen.
3. Den HPV-Abstrich vortexen und dann ca. 10 min stehen lassen.
4. Das Probenröhrchen dann kräftig vortexen.
5. Die Suspension in ein beschriftetes(von 1 bis....) 2,0 ml Safe-Lock Reaktionsgefäß überführen mit 2ml Einmalpipetten und für 5 min bei 2200 rpm zentrifugieren.
6. Danach in mit Papier ausgelegten Müllbeutel Überstand mit Schwung abkippen (Vorsicht: nicht spritzen!!!)
7. Nun unter der Werkbank arbeiten (am Abend vorher mit UV bestrahlt!). Das nun erhaltene Zellpellet in 400 μl PBS/ Thimerosal resuspendieren und gut mischen.
8. 200 μl entnehmen und in ein beschriftetes 1,5ml Gefäß überführen.
9. Das Gefäß wird bei -20°C eingefroren, die verbliebenen 200 μl werden für die DNA-Aufreinigung weiter verarbeitet. Wenn nötig kann das Material bis dahin auch bei -20°C eingefroren werden.

Zwecks Qualitätskontrolle sollte von der Sterilbank alle 4 Wochen eine Wischprobe entnommen werden: An mehreren Stellen ca. 500 μl Wasser auftropfen, 1-5 min belassen und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführen. Mit der nächsten HPV- PCR als Kontrolle bearbeiten.

Benötigte Materialien & Reagenzien:

Gelbe Kittel, Polytrap- Papier 295PE
Zentrifuge Biofuge Primo
Abfallbehälter für Infektiöse Materialien
Vortexer
Thermomixer
Pipettierhilfe
Etiketten geeignet für den Gefrierschrank
Faserschreiber, geeignet für Kryoröhrchen
Klebefilm
15 ml Spitzbodenröhrchen
Reaktionsgefäße 2,0 ml
Reaktionsgefäße 1,5 ml
2 ml Einmalpipetten, steril, einzeln verpackt
1 ml Einmalpipetten, steril, einzeln verpackt

Heraeus

Scientific Laboratories
Biozym
Rainin
Diversified Biotech
Roth
Tesa
Falcon
Eppendorf
Eppendorf
Falcon
Falcon

PBS ohne Ca/Mg pH 8.3 mit 0,005 %
250 μl verd. Thimerosal auf 500ml PBS Dulbecco - ohne Mg.

Charité CBF

Gynäkologische Tumورimmunologie

PD Dr. A. M. Kaufmann

Dokument Typ: Standard Protokoll	Dokument Titel: Aufreinigung von Gesamt DNA mittels QIAmp DNA mini Kit	Ersteller: A.Klau/ E. Glastetter
Kennung:: SOP Nr. 2	Version: Nr. 3	Datum: 10.03.09

Ziel der Methode:

Aufreinigung von Gesamt-DNA aus Tupfern und Zervixbürstchen

Allgemeines:

HPV-DNA frei arbeiten!!!!

- Dieser experimentelle Schritt wird stets in Räumlichkeiten außerhalb der HPV-Forschungslabore statt. Der QIamp-Aufarbeitungsplatz befindet sich im großen Raum der Nuklearmedizin.
- Die Arbeiten werden unter der PCR-Werkbank durchgeführt. Da evtl. HPV-DNA freigesetzt wird, sollte die Bank aus bleiben.
- Verwendung eines frischen gelben Schutzkittels.
- Die Pipetten regelmäßig mit DNA-Zap einsprühen und gewissenhaft säubern. Auch der Rotor der Zentrifuge soll regelmäßig gesäubert werden und ab und zu unter der Sterilbank mit UV-Licht bestrahlt werden.

Wenn ein neues Paket QIamp DNA Minikit geöffnet wird:

1. Proteinase K 6 ml Lösung mit Öffnungsdatum versehen!
2. Puffer AW1: Zugabe von 125 ml abs. Ethanol
3. Puffer AW2: Zugabe von 160 ml abs. Ethanol
! Auf den Flaschen die Zugabe vermerken!

Vorbereitung für Tupfermaterial:

1. Einen Heizblock auf 56 °C erhitzen.
2. **Stets ein frisches Polytrap 295PE Papier unterlegen.**
3. 200 µl des Abstricheluats mit 20 µl QIAGEN Proteinase K versehen und gut mischen.
4. Zugabe von je 200 µl AL-Puffer.
5. Gut mischen durch Vortexen (15 s).
6. Für 30 min bei 56 °C inkubieren.
7. Kurz abzentrifugieren wegen evtl. Kondenswassers.
8. Zugabe von je 200 µl Ethanol.
9. Vortexen und kurz abzentrifugieren.
10. Vorsichtig auf die Säule auftragen (Tropfen am äußeren Rand vermeiden!): Eppendorfpipette auf ca. 700 µl stellen.
11. Für 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren.
12. Das Sammelröhrchen anschließend verwerfen und durch ein Neues ersetzen.
13. Zugabe von 500 µl Puffer AW1 (ohne den Rand zu befeuchten).
14. Für 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren und Sammelröhrchen verwerfen.
15. Zugabe von 500 µl Puffer AW2 (ohne den Rand zu befeuchten).
16. Für 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren und Sammelröhrchen verwerfen.
17. Nun noch mal mit neuem Sammelröhrchen den Filter trocken!!!: zentrifugieren: 2 min bei 14000 rpm
18. 1,5 ml Reaktionsgefäße mit Eingangsnummer auf Deckel beschriften.
19. diese DNA-Säulchen mit 80µl Puffer AE (Elutionspuffer) versehen.
20. Für mind. 5 min bei RT inkubieren.
21. 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren.

22. Schritt 10 – 12 wiederholen.
23. Filter nun weg- DNA nun unten im Reaktionsgefäß!
24. Deckel zu und nun die Gefäße am Rand mit den entsprechenden Namensaufkleber oder selbst beschriften.
25. nach Säuberung wird die PCR-Werkbank für mind. 30 min mit UV-Licht bestrahlt.

Von den DNA-Eluaten werden nun je 10 µl DNA-Matrize für die GP5+/6+ PCR (PCR I und PCR II) und β-Globin-PCR eingesetzt.

Benötigte Materialien:

Qiamp DNA Minikit (Cat. No: 51308)
abs. Ethanol (für Molekularbiologie)
1,5 ml Reaktionsgefäße
Zentrifuge Biofuge Primo R
Vortexer
Thermomixer
Pipettierhilfen: 20µl, 200µl u. 1000µl
aerosol-resistente Filtertips
DNA-Zap
Protrap 295PE Papier

Qiagen
Merck
Eppendorf
Heraeus
Scientific Laboratories
Biozym
Eppendorf
Greiner Bioone
Roth
Schleicher & Schuell

Charité CBF

Gynäkologische Tumorummunologie

PD Dr. A. M. Kaufmann

Dokument Typ: Standard Protokoll	Dokument Titel: HPV-Typisierung mit der Luminex-Technologie	Ersteller: Dr. E. Glastetter
Kennung: SOP Nr. 8	Version: Nr. 3	Datum: 10.07.2007

Ziel der Methode:

Hybridisieren von PCR-Produkten aus dem GP5+/6+ Generalprimer System mit HPV-typspezifischen Sonden und ihre Detektion zur HPV-Typisierung

Durchführung:

- 1) Die interne Labornummer der Patienten-DNA zunächst in ein Pipettierschema eintragen unter P:\HPV-Typisierung\Luminex\Proben und unter dem aktuellen Datum abspeichern
- 2) Nach diesem Schema je 10 µl PCR-Produkt pro Well in eine 96-well PCR-Platte pipettieren.
- 3) TE-Puffer in ein Reservoir füllen
- 4) Mit Multikanalpipette je 7µl TE-Puffer aufziehen und zu jedem, mit PCR Produkt versehenen Well der 96-well PCR Platte, dazu pipettieren
- 5) Den Hybridisierungspuffer mit den Luminex-HPV Beads mischen:
Pro belegtes Well 33 µl Hybridisierungspuffer, entspricht bei einer vollbelegten Platte (96 Wells) 3168 µl gesamt.

Berechnung der Beadmenge:

Pro Spalte (die 96 Well Platte hat insgesamt 12 Spalten und 8 Reihen) werden von jeder Beadsorte 1 µl zum Hybridisierungspuffer pipettiert. Entspricht also bei einer vollbelegten Platte (96 Wells) 10µl pro Beadsorte.

- 6) mit einer Multikanalpipette werden zu jedem Well 33 µl des Beadmixes pipettiert, durch hoch- und runterziehen der Lösung mischen
- 7) Abdecken der 96-well PCR Platte mit der Polyolefin-Folie
- 8) 96-well Platte in Eppendorf-PCR-Gerät in Raum 4531 einsetzen, Programm „EG/xMAP denat.“ starten und für 5 min bei 95°C denaturieren
- 9) Währenddessen, falls nötig, den 96-well Aufsatz am Thermomixer im S2-Labor installieren und dieses Gerät auf 41°C vorheizen
- 10) Die Proben-Platte dann in den -20°C Kühlakku (R4502, GS1, Fach EG) für 96-wellplatten übertragen
- 11) Nach Abkühlen der Proben (ca. 1 min) wird die Platte in den Thermomixer überführt
- 12) Bei 350 rpm schütteln und für 45 min bei 41°C hybridisieren
- 13) Vorbereitung der Waschplatte: 15 min vor Ablauf der Hybridisierungszeit eine 96-well Millipore-Waschplatte mit je 100 µl/ well Waschpuffer versehen
- 14) Auf die Absaugvorrichtung der Vakuumpumpe legen, den Waschpuffer für 15 min einwirken lassen
- 15) Waschlösung dann durch Anschalten der Vakuumpumpe entfernen. Die Vakuumpumpe wird wieder ausgemacht, wenn ein Druck von 5-10 bar erreicht ist
- 16) Die PCR-Platte mit den Proben aus dem Thermomixer nehmen
- 17) Die Abdeckfolie vorsichtig von der PCR-Platte abziehen
- 18) Mit der Multikanalpipette nach einmaligem hoch und runterpipettieren die Proben in die Waschplatte überführen. Aufpassen bei der Orientierung (d.h. Well A1 aus der PCR-Platte sollte in Well A1 der Waschplatte landen usw.), zwischen den Proben immer die Spitzen wechseln
- 19) Flüssigkeit durch Anschalten der Vakuumpumpe entfernen, siehe 15)
- 20) Die Waschplatte kann auf der Absaugvorrichtung verbleiben, wenn Waschpuffer dazu pipettiert wird
- 21) 1x waschen: 100 µl Waschpuffer in jedes Well geben und den Waschpuffer durch Betätigung der Vakuumpumpe entfernen
- 22) Vorbereitung des Färbepuffers: für eine ganze 96-well Platte werden 8 ml Färbepuffer 5 µl Streptavidin-PE (entspricht 1:1600) zugesetzt
- 23) 75 µl pro well in die mit den Proben versehene 96-well Platte pipettieren

Anhang

- 24) Für 30 bis max. 40 min bei RT in einer kleinen Styropor- oder Pappbox auf einem horizontalen Schüttler (S2 Labor) inkubieren
- 25) Mit Hilfe der Vakuumpumpe nach Absaugen der Färbelösung noch 3x mit je 100 µl/Well Waschpuffer waschen
- 26) Dann in 80 µl/Well Waschpuffer aufnehmen und 5min in der Styroporbox schütteln (Horizontalschüttler in Raum 4503)
- 27) Die Proben sind nun fertig vorbereitet zur Vermessung im Biorad-Luminexgerät

Benötigte Puffer & Reagenzien*:

Bioplex™ COOH-Beads, diverse Sorten jeweils an HPV-typspezifische Oligonukleotidsonde gekoppelt	Biorad
Hybridisierungspuffer:	0,15M TMAC (Tetramethylammoniumchlorid) 75 mM Tris-HCl, pH 8.0 6 mM EDTA, pH 8.0 1,5 g/L I-Sarkosyl/N-Lauroylsarcosine(Sigma)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
Färbepuffer	2 M TMAC 75 mM Tris-HCl, pH 8.0 6 mM EDTA, pH 8.0 1,5 g/L I-Sarkosyl 1 mg/ml Casein
Blockpuffer-Waschpuffer	PBS 1 mg/ml Casein, pH 7.4± 0,1: 0,5g Casein auf 500 ml PBS
Streptavidin-R-Phycoerythrin	Molecular Probes (Invitrogen)

*Alle Puffer und Lösungen sollten in reinem, gekauftem Aqua bidest. angesetzt werden

Benötigte Materialien & Geräte:

96-well Polypropylen PCR-Thermoplatten	HJ-Bioanalytik GmbH
Polyolefin Abdeckfolie für Thermo PCR Platten	HJ-Bioanalytik GmbH, Art.Nr. 900320
96-well Waschplatte Multiscreen HTS, BV	Millipore
Multikanalpipetten Reservoir	
Pipettenspitzen	Roth
Vortexer	Scientific Laboratories
PCR-Gerät „Mastercycler EP Gradient“	Eppendorf
-20°C Kühlakkuständer 96-well	Eppendorf
Thermomixer mit Aufsatz für 96-Well Platten	Eppendorf
12-Kanal Pipetten 10µl, 100µl	Eppendorf
Andere Pipetten	Biohit
Vakuum Waschstation	Millipore
Bioplex-Luminex-Messstation	Biorad

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elena Vartazarova, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Evaluation eines Selbstabnahmesets für die deutschlandweite HPV-Prävalenzmessung mittels eines innovativen Genotypisierungstests selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Elena Vartazarova hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Yvonne Deléré, Melanie Schuster, Elena Vartazarova, Thomas Hänsel, Ingke Hagemann, Simone Borchardt, Heike Perlitz, Achim Schneider, Sabine Reiter, Andreas M. Kaufmann. Cervicovaginal Self-Sampling Is a Reliable Method for Determination of Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes in Women Aged 20 to 30 Years. J. Clin. Microbiol. 2011;49(10):3519-22.

Beitrag im Einzelnen:

Rekrutierung der Probandinnen, Aufarbeitung der Proben, Durchführung der PCR mit anschließender HPV-Genotypisierung mittels Luminex-Technologie.

Publikation 2: Cornelius Renschmidt, Andreas M. Kaufmann, Ingke Hagemann, Elena Vartazarova, Ole Wichmann, Yvonne Deléré. Risk factors for cervical HPV infection and high-grade intraepithelial lesion in women aged 20-31 years in Germany. Int J Gynecol Cancer 2013;23:519-26.

Beitrag im Einzelnen:

Rekrutierung der Probandinnen, Aufarbeitung der Proben, Durchführung der PCR mit anschließender HPV-Genotypisierung mittels Luminex-Technologie.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

1. Yvonne Deléré, Melanie Schuster, Elena Vartazarova, Thomas Hänsel, Ingke Hagemann, Simone Borchardt, Heike Perlitz, Achim Schneider, Sabine Reiter, Andreas M. Kaufmann. Cervicovaginal Self-Sampling Is a Reliable Method for Determination of Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes in Women Aged 20 to 30 Years. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(10):3519-22.
2. Cornelius Remschmidt, Andreas M. Kaufmann, Ingke Hagemann, Elena Vartazarova, Ole Wichmann, Yvonne Deléré. Risk factors for cervical HPV infection and high-grade intraepithelial lesion in women aged 20-31 years in Germany. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23:519-26.

Danksagung

Herrn PD Dr. Andreas .M. Kaufmann möchte ich für die Vergabe und Betreuung der Dissertation und ganz besonderes für seine Geduld, wertvolle Anregungen und immer offenes Ohr danken.

Ursula Schiller und Christiane Fangerau danke ich für die nette Einarbeitung im Labor.

Dr. Günter Cichon, Dr. Christina Roth, Dr. Roberto Kurzeja, Dr. Inka Drechsler und Prof. Achim Schneider danke ich für die Unterstützung bei der Rekrutierung der Probandinnen aus der Dysplasiesprechstunde der Charité.

Für die Unterstützung bei der Rekrutierung der Probandinnen aus gynäkologischen Arztpraxen in Kiel, Haldensleben und Berlin danke ich Dr. Ingke Hagemann, Dr. Heike Perlitz und Dr. Simone Borchardt.

Frau Dr. Yvonne Deleré möchte ich für die geduldige Beratung und Unterstützung bei einigen statistischen Auswertungen danken.

Ich danke meiner Gastmutter, Tirza Seifert-Reuter, fürs Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinem Freund, Dipl. Ing. Sevan Özodabasyan, danke ich für die Hilfe bei den nervenaufreibenden Formatierungsproblemen.