

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

DISSERTATION

Verteilung der genitalen HPV Subtypen in der weiblichen Bevölkerung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Pia Dennemark

aus Berlin, Deutschland

Datum der Promotion: 14.02.2014

Widmung

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Widmung	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Abstrakt	9
2 Abstract	11
3 Einleitung	13
4 Material und Methodik	20
4.1 HPV DNA Nachweis	20
4.1.1 DNA Extraktion.....	20
4.1.2 PCR Analyse.....	21
5 Ergebnisse	25
5.1 Verteilung der HPV-hr und -lr Typen in der Studienpopulation	28
5.2 Altersverteilung	32
5.3 Verteilung der Misch- und Mehrfachinfektionen im Hinblick auf die existierenden Impfungen.....	38
5.4 Altersverteilung der Prävalenzen für einzelne Subtypen.....	40
5.5 Vergleich zur Studie von 1997 ³⁸	43
6 Diskussion	45
7 Literaturverzeichnis	53

8	Eidesstattliche Versicherung.....	61
9	Lebenslauf.....	62
10	Danksagung.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Typisierung der HPV positiven Patientinnen unter Einbeziehung der Mischinfektionen	26
Abbildung 2: HPV-hr Subtypen nach Häufigkeit und prozentualem Anteil	29
Abbildung 3: HPV-lr Subtypen nach Häufigkeit und prozentualem Anteil	30
Abbildung 4: Verteilung der Prävalenzen von HPV-lr Infektionen ohne Mischinfektionen auf die Altersgruppen.....	32
Abbildung 5: Verteilung der Prävalenzen von HPV-hr Infektionen ohne Mischinfektionen auf die Altersgruppen.....	33
Abbildung 6: Verteilung der Prävalenzen von Mischinfektionen auf die Altersgruppen.....	33
Abbildung 7: Verteilung der Prävalenzen von HPV-hr positiven und Mischinfektionen auf die Altersgruppen.....	34
Abbildung 8: Verteilung der Prävalenzen von nicht klassifizierbaren HPV Infektionen auf die Altersgruppen.....	35
Abbildung 9: Prävalenz der HPV-hr Typen inklusive der hr Typen, die als Mischinfektionen gefunden wurden, sowie der HPV-lr Infektionen und der linear prognostizierbare Trend der Altersentwicklung	36
Abbildung 10: Prävalenz der HPV-hr und -lr Typen sowie der nicht klassifizierbaren Typen und der linear prognostizierbare Trend der Altersentwicklung	36
Abbildung 11: Verteilung der Prävalenzen aller HPV Typen inklusive Misch- und Mehrfachinfektionen auf die Altersgruppen	37
Abbildung 12: Häufigkeit der Einzel- und Mischinfektionen für HPV-lr Subtyp 6 und 11	38
Abbildung 13: Häufigkeit der Einzel- und Mischinfektionen für HPV-hr Subtyp 16 und 18	39

Abbildung 14: Altersverteilung HPV 16.....	40
Abbildung 15: Altersverteilung HPV 18.....	40
Abbildung 16: Altersverteilung HPV 31.....	41
Abbildung 17: Altersverteilung HPV 45.....	41
Abbildung 18: Altersverteilung HPV 51.....	42
Abbildung 19: Altersverteilung HPV 66.....	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Anzahl und prozentualer Anteil der Patientinnen in den einzelnen Altersgruppen.....	25
Tabelle 2a:	Anteil der Mehrfachinfektionen und der Mischinfektionen im Studienkollektiv	27
Tabelle 2b:	Verteilung der HPV Typen als Mischinfektionen zwischen HPV-hr und -lr und Anteil der Mehrfachinfektionen durch kombinierte HPV-hr oder HPV-lr Typen	27
Tabelle 3:	HPV-hr Subtyp Verteilung bei Einzelinfekten und bei Wertung auch der mehrfachen Infektionen mit HPV-hr Typen	29
Tabelle 4:	HPV-lr Subtypen nach Häufigkeit und prozentualem Anteil	30
Tabelle 5:	Vergleich der HPV-Prävalenz der Subtypen der Studie von 1996 und 2008	44

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIS	Adenocarcinoma in situ
AK	Antikörper
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
DNA	Deoxyribonucleic Acid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HNO	Hals Nasen Ohren
HPV	Humanes Papillomavirus
hr	high risk
KFU	Krebsfrüherkennungsuntersuchung
lr	low risk
PCR	Polymerase Chain Reaction
STIKO	Ständige Impfkommission
Tab.	Tabelle
VLP	Virus-like particles

1 Abstrakt

Einleitung:

Das Zervixkarzinom ist nach dem Mammakarzinom weltweit die zweithäufigste Todesursache bei Frauen.¹ Eine persistierende Infektion mit einem onkogenen (hr) Subtypen des Humanen Papillomavirus ist durch zahlreiche Studien als Ursache eines Zervixkarzinoms anerkannt.⁴⁻⁸

In dieser Arbeit sollen Prävalenzen und Verteilung der HPV-Subtypen sowie Altersstruktur der Prävalenzdaten für die verschiedenen HPV-Subtypen untersucht werden. Weiterhin soll der Anteil der impfrelevanten HPV-hr Typen bei HPV-hr positiv getesteten Patientinnen und die Bedeutung der HPV-hr und HPV-lr Typen bei gleichzeitiger Infektion durch mehrere HPV Typen ermittelt werden.

Material und Methodik:

In die retrospektiv angelegte Studie wurden insgesamt 4000 Patientinnen eingeschlossen. Im Labor wurden die einzelnen HPV Subtypen mittels PCR nachgewiesen. Alle ausgearbeiteten Daten wurden in Microsoft Excel implementiert und anschließend ausgewertet.

Ergebnisse:

Die Studie beruht auf Daten von 4000 Patientinnen, die sich im Zeitraum vom März 2006 bis Februar 2008 einem HPV-Screening unterzogen. Die Untersuchungen wurden im Rahmen der routinemäßigen Krebsvorsorgeuntersuchung als Wahlleistung oder bei Selbstzahlerinnen in insgesamt 29 gynäkologischen Arztpraxen durchgeführt. Davon waren 2996 (74,9 %) Frauen HPV negativ und 1004 (25,1 %) Patientinnen HPV positiv. Kumulativ konnten 11 low risk und 14 high risk Subtypen des Papillomavirus identifiziert werden. Insgesamt wurden 354 (8,9 %) Patientinnen positiv auf einen HPV-lr und 644 (16,1 %) positiv auf ein HPV-hr getestet. Bei 185 (4,6 %) der positiv getesteten Patientinnen war es nicht möglich, einen Subtypen zu identifizieren, welche folglich als nicht klassifizierbar deklariert wurden. Insgesamt konnten 170 (4,3 %) Mischinfektionen mit HPV Subtypen nachgewiesen werden. Bei 220 (34 %) Patientinnen konnte ein HPV-hr Subtyp 16 festgestellt werden, welcher bei weitem das häufigste Vorkommen hatte. Nur 55 (9 %) Patientinnen hatten einen positiven Nachweis auf HPV-hr Subtyp 18. Bei beiden Subtypen bestand eine Zweigipfeligkeit in den Altersgruppen zwischen dem 25. und 34. Lebensjahr sowie zwischen dem 40. und 44. Lebensjahr.

Diese Zweigipfeligkeit wird insbesondere bei Einzelinfektionen deutlich, aber auch die Mischinfektionen kommen in den erwähnten Altersabschnitten gehäuft vor.

Diskussion:

Nach Auswertung zweier PATRICIA-Studien zeigte das bivalente Vakzin gegen den HPV-hr Subtypen 16 und 18 eine kreuzprotektive Effektivität gegen vier weitere onkogene HPV-hr Subtypen, nämlich 33, 31, 45 und 51. Betrachtet man daraufhin alle impfsensiblen onkogenen Subtypen in ihrer Gesamtheit, so machen diese kumulativ 69,8 % aller HPV-hr positiv getesteten Berliner Frauen aus. Anhand dieser sehr deutlichen Ergebnisse lässt sich die bereits bestehende Empfehlung der STIKO für eine prophylaktische Impfung für alle Mädchen von 12 bis 17 Jahren aussprechen. Über dieses Alter hinaus liegt eine Impfung laut STIKO in der Entscheidung der Frau und ihres behandelnden Arztes, da aufgrund der aktuellen Datenlage eine „intention-to-treat“ noch nicht ausreichend nachgewiesen werden konnte.

2 Abstract

Introduction

Following breast cancer, cervical cancer is the second most common cause of death in women worldwide.¹ Numerous studies confirm persistent infection with an oncogenic (high-risk) subtype of the Human Papilloma Virus as a cause of cervical cancer.⁴⁻⁸

In this study, the prevalence and distribution of HPV (Human Papilloma Virus) subtypes as well as an age differentiation of the prevalence data of the the various HPV subtypes are examined. Furthermore, the proportion of vaccination relevant HPV hr (high-risk) types in HPV hr positive patients and the significance of HPV hr and HPV lr (low-risk) types in the case of simultaneous infection with several HPV types are determined.

Methods

A total of 4,000 patients were included in a retrospective study. The individual HPV types were determined in laboratory examinations using PCR (Polymerase Chain Reaction). The collected data sets were compiled in Microsoft Excel and evaluated.

Results

The study involved 4,000 patients who participated in an HPV screening in the time period from March 2006 to February 2008. The examinations were performed as part of routine cancer screening in 29 office-based gynecological practices in Berlin.

2,996 (74.9 %) of the women were HPV negative and 1,004 (25.1 %) HPV positive. In the cumulated figures, 11 low risk and 14 high risk subtypes of HPV were identified. In total, 354 (8.9 %) patients were positively identified as HPV low-risk and 644 (16.1 %) as HPV high-risk. In 185 (4.6 %) of the positive patients, the subtype could not be identified and these cases were declared as non-classified. In total, 170 (4.3 %) cases of mixed infections with HPV subtypes were identified. In 220 (34 %) patients, an HPV hr subtype 16 was confirmed which is by far the most common form. Only 55 (9 %) of patients showed a confirmed positive HPV hr subtype 18. Both subtypes showed a double age-peak in the age groups 25 to 34 as well as between 40 and 44. This was particularly clear for the single infections but the mixed infections were also more frequent in the two specified age groups.

Discussion:

The evaluation of 2 PATRICIA studies showed that bivalent vaccination against the HPV hr subtypes 16/18 has a cross-protective effect against 4 further oncogenic pathogens, namely 33, 31, 45 and 51. If one considers, in total, all oncogenic sub-types which are sensitive to vaccination, the cumulative figure accounts for 69.8 % of the HPV hr positive women in the Berlin study group. On the basis of these very clear results, the already existing recommendation of the German Ständige Impfkommision STIKO (Permanent Vaccination Commission) for prophylactic vaccination of all girls aged between 12 and 17 can be confirmed. According to STIKO, a vaccination in women beyond this age depends on the decision of a woman and her physician since an "intention to treat" based on current data cannot be sufficiently confirmed.

3 Einleitung

Zervixkarzinom ist nach dem Mammakarzinom das am zweithäufigsten vorkommende Karzinom und die zweithäufigste Todesursache bei Frauen weltweit.¹ Auch in den entwickelten Ländern bleibt es die zweithäufigste Todesursache bei Frauen unter 45 Jahren. Insgesamt bildet das Zervixkarzinom einen Anteil von 6 % aller menschlichen Krebserkrankungen. Vier von fünf neuen Fällen werden gegenwärtig in den Entwicklungsländern diagnostiziert.^{2,3}

Inzwischen wurde durch zahlreiche Studien bewiesen, dass das Zervixkarzinom durch eine Infektion mit onkogenen Subtypen des Humanen Papillomavirus (HPV) verursacht wird.⁴⁻⁶ Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass dies unabhängig von anderen Risikofaktoren und übereinstimmend in verschiedenen Ländern auf allen Kontinenten der Welt geschieht. 22 Länder weltweit meldeten eine HPV Prävalenz von 93 %.^{7,8}

HPV ist ein kleiner, geschlossener kreisförmiger episomaler Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure (DNA) Virus. Infektiöse Partikel bestehen aus dem ca. 8000 Basenpaar-Genom mit einer Kapsel von einem ungefähren Durchmesser von 55 nm. Papillomaviren besitzen ein nicht umhülltes Kapsid, das aus dem Hauptkapsidprotein L1 und einem kleineren L2-Protein besteht.⁹ Die Papillomavirus Familie umfasst eine noch immer größer werdende Gruppe, unter denen inzwischen mehr als hundert vollständig sequenziert und identifiziert wurden.^{6,10}

Da es keine eindeutig feststehenden Kriterien für die Klassifizierung von HPV Typen in low risk (lr) und high risk (hr) Gruppen gibt, existiert für viele HPV Typen mit einer niedrigen Prävalenz keine Risikoeinstufung. High risk Viren sind diejenigen, die am häufigsten in invasiven Karzinomen gefunden werden. In den meisten Studien zeigte HPV 16 die höchste Prävalenz bei Frauen mit zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN) oder einem Zervixkarzinom.^{11, 12} Vor allem das Plattenepithelkarzinom wird mit HPV 16 und seinen phylogenetisch verwandten HPV Typen 31, 35 und 52 in Verbindung gebracht. Weiterhin treten häufig bei Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom HPV Subtypen 33 und 58 auf. HPV 18 ist der zweithäufigste Karzinom assoziierte Subtyp, der mit seinen phylogenetisch verwandten HPV Typen 39, 45 und 59 mit Adenokarzinomen und adenosquamösen Karzinomen in Beziehung gebracht wird. Gründe für eine solche Spezifität sind ungewiss.^{6,8}

Low risk Viren verursachen hauptsächlich benigne exophytische genitale Warzen und sind in 90 % von Condylomata acuminata nachweisbar⁶. Sie werden aber auch mit niedriggradigen

Plattenepithelläsionen assoziiert. Man weiß, dass die Genome von HPV 16 und HPV 18 fähig sind, menschliche Keratinozyten zu immortalisieren, während die DNA von low risk Typen dies nicht kann. Zwei virale Genprodukte sind für diese Immortalisierung von menschlichen Epithelzellen notwendig: die E6 und E7 Gene. Bei chronisch Infizierten kann es zur verstärkten Expression dieser beiden viralen Proteine kommen, die man auch als Onkogene bezeichnet. Dies führt zum Eintritt in die S-Phase und in der Folge zur unkontrollierten Zellteilung bei gleichzeitiger Akkumulation von DNA-Schäden. Ursache hierfür ist das durch E6 und E7 außer Kraft gesetzte p53-abhängige Reparatur- und Apoptose-System. Eine Störung des Spindelapparates beeinträchtigt zudem die Mitose. In manchen Fällen werden HPV-DNA-Bruchstücke ins Zellgenom integriert. Der Ausfall des viralen Replikationsmodulators E2 ist die Folge und führt zu einer gesteigerten Expression von E6 und E7. In hochgradigen CIN-Läsionen und Zervixkarzinomen wird in den proliferierenden Zellteilen eine starke E6/E7 Expression beobachtet. HPV 16 und HPV 18 werden deshalb auch als Gruppe 1 Karzinogene eingestuft.^{6, 13, 14}

HPV wird hauptsächlich durch Geschlechtsverkehr übertragen und ist eine der häufigsten sexuell übertragenen Krankheiten. Eine HPV Infektion bei jungen Frauen ist meist vorübergehend und kurzlebig; es kommt zu einer spontanen Regression.¹⁵⁻¹⁷ Frauen zwischen 21 und 30 Jahren haben eine hohe Frequenz an sequentiellen HPV Infektionen, die wahrscheinlich auf höhere sexuelle Aktivität zurück zu führen ist. Die Inzidenz einer genitalen HPV Infektion nach Erwerb eines neuen Sexualpartners ist sehr hoch. Mehr als 80 % der sexuell aktiven Frauen waren mit dem Virus in Kontakt, die meisten innerhalb der ersten 3 - 4 Jahre nach dem ersten Geschlechtsverkehr. Dieser Kontakt erfolgt in den meisten Ländern im Alter zwischen 15 und 17 Jahren. Die geringe Prävalenz des Zervixkarzinoms bei jungen Frauen unterstreicht die benigne Natur einer initialen HPV Infektion, die eine Regressionsrate von 50 % innerhalb von sechs Monaten und 90 % innerhalb von 24 Monaten aufweist. Die HPV Übertragung ist jedoch nicht auf ein junges Alter begrenzt, sondern erfolgt während des gesamten Lebens einer sexuell aktiven Frau.

Viele HPV Infektionen bleiben klinisch asymptomatisch, tragen aber zur weiteren Verbreitung dieser Infektionen bei. Das Auffinden viraler DNA in zytologischen Abstrichen und Biopsiegewebe gilt als Marker einer HPV Exposition. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) erlaubt die genaue Beurteilung einer viralen DNA Präsenz in zervikalen Proben, deren Quantifizierung und Bestimmung der unterschiedlichen HPV Typen. Sie ist die Methode mit der höchsten Sensitivität für HPV DNA in klinischen Proben.

Das Zervixkarzinom wird histologisch in Adenokarzinom, adenosquamöses Karzinom und Plattenepithelkarzinom gegliedert. Zervikale intraepitheliale Neoplasie Grad 2, 3 und Adenokarzinom in situ (AIS) sind obligate und unmittelbare Vorstufen eines invasiven Karzinoms, die fortschreiten, sich aber auch zurück entwickeln können.¹⁸

Die Infektion mit einem HPV-high risk (HPV-hr) Typ ist notwendig für die Entwicklung einer CIN und damit eines Zervixkarzinoms. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Persistenz einer HPV Infektion.¹⁹ Prospektive Studien zeigen, dass eine nachweisbare persistierende Präsenz von HPV DNA bei gesunden Frauen einer CIN vorausgeht.²⁰⁻²²

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die notwendige Dauer einer HPV Infektion zur Entwicklung, Aufrechterhaltung und dem Fortschreiten einer CIN 3 und höhergradigen Läsionen unbekannt. Studien belegen aber, dass hochgradige Läsionen stark mit HPV Typ spezifischer Persistenz assoziiert sind.^{3, 19, 23, 24}

Es existieren große Übereinstimmungen der HPV Typen im ursprünglichen HPV Abstrich mit den Typen der aus dem invasiven Karzinom entnommenen Biopsie. Das Risiko zervikaler Neoplasien und hochgradiger Läsionen ist bei Frauen, die wiederholt für den identischen HPV Typ positiv sind, signifikant höher als bei Frauen, die positiv für unterschiedliche HPV Typen sind, vorübergehende oder bereits vergangene Infektionen haben.²⁵ Studien stimmen darin überein, dass multiple HPV-hr Infektionen kein höheres Risiko zur Entwicklung einer zervikalen Neoplasie in den folgenden zwei bis drei Jahren darstellen als eine Infektion mit einem einzelnen HPV-hr Typ.²⁶ Eine persistierende HPV Infektion ist der zuverlässigste Faktor, ein Zervixkarzinom zu prognostizieren.¹⁹ Ein persistierender HPV DNA Nachweis nach bereits erfolgter Behandlung einer CIN 2/3 ist ein präzises Vorzeichen für ein Rezidiv und hat eine signifikant höhere Sensitivität als wiederholte suspekthe zytologische Abstriche innerhalb von 24 Monaten nach chirurgischer Intervention.²⁷ Frauen, die chronische HPV DNA Träger bleiben, sind als Hochrisikogruppe für ein Zervixkarzinom einzustufen.

Wiederholte HPV Abstriche bei Frauen, die auf virale Persistenz und zervikale Abnormalitäten überwacht wurden, haben gezeigt, dass die mittlere Dauer einer Infektion mit einem HPV-hr Typ ca. 8 Monate beträgt, die mittlere Dauer einer Infektion mit einem HPV-lr Typ 4,8 Monate. Eine Infektion mit HPV-hr Subtyp 16 neigt dazu, länger zu bestehen als durchschnittliche Infektionen mit anderen hr-Typen.²⁶

Ein starker demographischer Einflusswert für eine HPV Infektion ist das Alter. Es besteht eine sehr hohe Prävalenz bei jungen Frauen, ein anschließend rascher Abfall der Prävalenz bei Frauen zwischen 40 und 50 Jahren und ein leichter Anstieg bei Frauen zwischen 55 und 59 Jahren. Die Inzidenz von HPV Typ 16 fällt dabei signifikant, während man einen Anstieg von HPV Typ 39, 52 und 58 beobachten kann.^{17, 27} Es besteht jedoch gegenwärtig Unsicherheit, was den Abfall der altersspezifischen HPV Prävalenz bei Frauen zwischen 30 und 40 Jahren betrifft. Der Grund für den zweiten Gipfel von HPV Nachweisen in der höheren Altersgruppe ist unklar. Die Übereinstimmungen dieser Ergebnisse in vielen individuellen Studien in Ländern mit beträchtlichen Unterschieden im Sexualverhalten deuten darauf hin, dass diese Beobachtungen auf biologische Veränderungen wie einem menopausalen, hormonellen und immunologischen Zustand basieren. Diese biologischen Veränderungen könnten einen positiven HPV Nachweis einer vor vielen Jahren erfolgten Exposition und bis dahin unentdeckten HPV Infektion verursacht haben. Auf der anderen Seite zeigen individuelle Kohortenstudien und Umfragen über Sexualverhalten, dass eine wachsende Anzahl von Sexualpartnern in mittlerem und höherem Alter nicht ungewöhnlich ist.^{18, 25, 28}

Die stärkste Korrelation zwischen HPV Positivität und Karzinom zeigt sich bei älteren Frauen (Alter > 50 Jahre), obwohl bei postmenopausalen Frauen der prozentuale Anteil eines positiven HPV Nachweises sinkt und für den Rest des Lebens niedrig bleibt. Höheres Alter und eine HPV-hr Infektion gelten also als Risikofaktoren für eine persistierende Infektion und ein Zervixkarzinom.²⁷

Multiple HPV-hr Infektionen sind häufiger bei jungen Frauen. Es konnte jedoch keine altersabhängige Risikoerhöhung für eine zervikale Neoplasie mit multiplen HPV Infektionen gefunden werden.²⁷

Der sozioökonomische Status scheint ebenfalls mit der Prävalenz von HPV Infektionen verbunden zu sein. Ein weiterer etablierter Risikofaktor ist die geographische Herkunft. Hier bestehen regionale Abweichungen in der Verteilung bestimmter HPV Typen, im sexuellen und reproduktiven Lebensstil (Alter beim ersten Geschlechtsverkehr, hohe Parität), beim Rauchen und bei hormonellen Therapien (Langzeitgebrauch von oralen Kontrazeptiva). Eine Beeinflussung von dadurch bedingtem Sexualverhalten und regelmäßigen Vorsorgeuntersuchungen konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Klassische Marker sind andere Geschlechtskrankheiten in der Vorgeschichte. Auch das Sexualverhalten der Geschlechtspartner spielt eine zentrale Rolle bei der Inzidenz von Zervixkarzinom.^{28, 29}

Zervikale Neoplasien werden meist bei Frauen über 30 Jahren erfasst. Der Nachweis von HPV DNA bei Frauen mit zytologisch normalen Papanicolaou-Abstrichen kann das mögliche Risiko eines zukünftigen Zervixkarzinoms voraussagen.

In Abwesenheit einer viralen DNA entwickelt sich kein Zervixkarzinom. Die meisten epidemiologischen Studien über den Zusammenhang von HPV Infektion und Zervixkarzinom wurden allerdings mit Proben durchgeführt, die erst nach der Karzinomdiagnose entnommen wurden.²⁰ Durch das bereits entstandene Karzinom wächst die HPV infizierte Gewebemasse, so dass ein HPV Nachweis vereinfacht wird. Weiterhin geben solche Studien keinen Aufschluss über die zeitliche Reihenfolge des Geschehens. Prospektive Studien müssen das Auftreten eines invasiven Karzinoms als Endpunkt definieren, um Rückschlüsse auf die Ursachen von Zervixkarzinomen ziehen zu können.

Um die potentielle weltweite Bedeutung von Impfstoffen gegen HPV Typ 16 und 18 prognostizieren und weitere HPV Typen in zukünftigen HPV Impfungen einsetzen zu können, sind weitere Daten zur HPV Typ Verteilung bei Frauen mit invasivem Zervixkarzinom und seinen Vorstufen notwendig.

Weiterhin wird eine Abschätzung der HPV Typ Verteilung bei Frauen mit Zervixkarzinom über die letzten acht bis zehn Jahre benötigt, um eventuelle Auswirkungen der Impfung (Dominanz anderer HPV-typen) erkennen und neue effektive HPV Impfstoffe herstellen zu können.

Bei der Ausheilung von HPV Infektionen ist die Bedeutung der körpereigenen Immunabwehr bei Patientinnen mit supprimierten Immunsystemen von herausragender Wichtigkeit. Bei Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) Infizierten zum Beispiel sowie Transplantatempfängern mit iatrogenen Immunsuppression treten HPV-induzierte Dysplasien und Karzinome häufiger auf.³⁰ Intakte CD4-T-Lymphozyten spielen demnach bei der Abwehr von HPV Infektionen eine wesentliche Rolle.³¹ Im Mittel sind HPV-Kapsid-spezifische Antikörper (AK) 18 Monate nach einer Infektion nachweisbar. Bei niedrigem AK-Titer bleibt die Hälfte der Infizierten jedoch seronegativ. Eine Serokonversion ist oft mit einem persistierenden Infektionsverlauf assoziiert.³² Eine Seropositivität bietet keinen Schutz vor Reinfektionen.³³ Bei immunkompetenten Frauen heilen HPV Infektionen vorwiegend über die zelluläre Immunantwort.

Im Rahmen der prophylaktischen HPV Impfung sind virusneutralisierende AK (humorale Immunantworten) immunologische Abwehrmechanismen.

Für die Bildung der virusneutralisierenden AK ist das Hauptkapsidprotein L1 primär verantwortlich, damit virusneutralisierende AK nach Immunisierung gebildet werden können. Da diese AK meistens gegen konformationelle Epitope des Kapsids gerichtet sind, müssen Sie bei der Immunisierung angeboten werden. Dafür wurde das L1-Gen der betreffenden HPV-Typen isoliert, wobei sich die L1-Proteinmonomere spontan erst zu Pentameren und dann zu sogenannten Virus ähnlichen Partikeln („virus-like-particles“ VLP) zusammenfügen.⁹

VLP ähneln der HPV Struktur, ohne infektiöses oder onkogenes genetisches Material zu enthalten oder toxisch zu sein. Sie induzieren die gleichen virusneutralisierenden AK wie natürliche Partikel und bilden daher ideale Vakzine, um eine Inhibition der Virusinfektion einzuleiten.⁹

Seit Oktober 2006 existiert ein Impfstoff gegen HPV-hr Subtyp 16 und 18 sowie HPV-lr Subtyp 6 und 11 (Gardasil®). Seit Oktober 2007 gibt es einen alternativen Impfstoff (Cervarix®), welcher nur gegen HPV-hr Subtyp 16 und 18 immunisiert.^{1,34}

Die groß angelegte PATRICIA-Studie konnte bei persistierender Infektion sowie CIN2+ positiven Patientinnen (mit oder ohne HPV Subtyp 16/18 Coinfektion) kreuzprotektive Wirkungen des bivalenten (Cervarix®) Impfstoffes gegen HPV Subtypen 33, 31, 45 und 51 belegen.³⁵ In Anbetracht der bisherigen Entwicklung sind weitere Fortschritte zu erwarten.

Mit der Kreuzprotektion wäre eigentlich ein breiter Schutz gegen eine HPV Infektion bei einer Impfung zu erwarten. Allerdings bestehen dabei zwei Probleme: Die Impfung hat ein relativ breites Altersfenster, d.h. sie wird je nach Krankenkasse von 12-18 oder auch bis 27 Jahren übernommen. Ein Teil der Frauen kann also bereits vor der Impfung HPV erworben haben. Denn ist ein HPV Typ erst einmal in die Basalzellen eingedrungen, schützen die durch die Impfung erzeugten hohen AK Konzentrationen nur gegen eine Reinfektion. Allerdings konnte auch bei über der Altersgrenze liegenden Frauen mit einer HPV assoziierten Erkrankung durch Immunisation das Risiko für ein erneutes Auftreten einer HPV Läsion gesenkt werden.³⁶

Das zweite Problem ist, dass in Deutschland die Bereitschaft, sich impfen zu lassen, leider nicht sehr hoch ist. Eine Impfstudie in Australien gab erste Hinweise, dass die Inzidenz einer zervikalen Dysplasie nach Impfung um fast die Hälfte gesenkt werden konnte.³⁷ Dies lässt sich jedoch nur sehr begrenzt auf Deutschland übertragen. Denn anders als in Australien oder den skandinavischen Ländern wie Finnland ist die Rate der geimpften Mädchen und Frauen nicht über 90 %, sondern liegt in Deutschland bei ca. 30 %.

Damit liegt eine völlig andere Situation vor, so dass ein protektiver Effekt der Impfung in Deutschland nur sehr verzögert zu erwarten sein wird. Zudem werden sich die Verteilungen der Prävalenzen der verschiedenen Subtypen anders ändern als in den Ländern mit einer hohen Impfbeteiligung. Gerade die mit der Impfung vermeidbaren Infektionen mit den HPV Typen 16 und 18 sollten in einem gewissen Zeitraum in der Population deutlich rückläufig sein oder sogar gänzlich verschwinden.

In dieser Arbeit sollen deshalb die Prävalenz und die Verteilung der HPV-Subtypen untersucht werden. Gleichzeitig sollen Aussagen über die Altersstruktur der Prävalenzdaten für die verschiedenen HPV Subtypen erarbeitet werden. Weitere Fragen betreffen den Anteil der impfirelevanten HPV-hr Typen bei HPV-hr positiv getesteten Patientinnen und die Bedeutung der HPV-hr und HPV-lr Typen bei gleichzeitiger Infektion durch mehrere HPV Typen. Da bereits 1997 in den auch in dieser Untersuchung einbezogenen Arztpraxen eine ähnliche Untersuchung im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) durchgeführt worden war³⁸, bestand die Möglichkeit, die damals ermittelten Prävalenzen mit den in der Studie 10 Jahre später festgestellten Prävalenzen zu vergleichen. Obwohl das Studiendesign unterschiedlich war (1997 wurde der HPV Test gratis angeboten und in der aktuellen Studie war der Test kostenpflichtig oder wurde von Privatkassen übernommen), sollte auch die Frage beantwortet werden, ob das Monitoring der Laborbefunde Rückschlüsse auf die aktuelle Entwicklung der HPV-Subtypen gestattet und sich als Instrument einer kontinuierlichen Beobachtung eignet.

4 Material und Methodik

In die retrospektiv angelegte Studie wurden insgesamt 4000 Patientinnen eingeschlossen. Die Untersuchungen wurden im Rahmen der Krebsvorsorgeuntersuchungen bei Privatpatientinnen oder Selbstzahlerinnen durchgeführt. Die Patientinnen wurden im Zeitraum März 2006 bis Februar 2008 in 29 gynäkologischen Arztpraxen in Berlin untersucht. Alle Abstriche wurden routinemäßig im Labor der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum aufgearbeitet und analysiert. Alle Patientendaten wurden initial schriftlich dokumentiert und für die Ausarbeitung der Studie digitalisiert. Ein besonderes Augenmerk wurde auf das Alter der Patientinnen und die Inzidenz der HPV-hr sowie HPV-lr Subtypen gelegt. Im Labor wurde jede HPV DNA isoliert, die einzelnen Subtypen konnten mittels PCR wie unten beschrieben nachgewiesen werden.

Alle ausgearbeiteten Daten wurden in Microsoft Excel implementiert und anschließend ausgewertet.

4.1 HPV DNA Nachweis

4.1.1 DNA Extraktion

4.1.1.1 Labormaterialien

Thermoblock (Techne), Thermomixer compact (Eppendorf), Zentrifuge 5415 R (Eppendorf), Multipette (Eppendorf), Combitips 0,5 ml, 5 ml, 10 ml (Eppendorf), Pipetten (Eppendorf) 10µl, 100µl, 1000µl, Filtertips (Greiner bio-one) FT 10 E, 100, 1000, Eppendorfröhrchen, Reagiergefäß (SafeSeal) 1,5 ml, Thermocycler T1 (Biometra), Vortex-Mixer VF2 (Janke & Kunkel), DNA Columns, Collection Tubes 2 ml, Einweghandschuhe

4.1.1.2 Reagenzien und Testkits

Qiagen Mini Kit, ATL Puffer (Tissue lysis buffer), Puffer AL (lysis buffer), Puffer AW1 (wash buffer 1: 242 ml concentrate add 320 ml ethanol to obtain 562 ml buffer), Puffer AW2 (wash buffer 2: 40,5 ml concentrate add 95 ml ethanol to obtain 135,5 ml buffer), Puffer AE (Elution Buffer), Ethanol absolut (Merck)

4.1.1.3 Durchführung

Es werden 500 µl Puffer ATL in einem Eppendorfröhrchen vorgelegt.

Die Probe (der trockene Tupfer des HPV-Abstriches) wird in dieses Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 90 °C inkubiert (Nukleaseinaktivierung).

Dann werden 500 µl Puffer AL und 50 µl Proteinase K hinzugefügt, die Proben 10 Sekunden lang auf einem Vortex-Mixer gemischt, 20 Minuten bei 70 °C inkubiert und zentrifugiert. Es werden weitere 500 µl Ethanol hinzugefügt, die Probe wiederum 10 Sekunden auf dem Vortex-Mixer gemischt und zentrifugiert.

Nun werden 650 µl davon auf die Extraktionssäule pipettiert und 1 Minute lang bei 8000 U/min zentrifugiert. Die Säule wird auf eine neue Collection Tube gesetzt. Dann werden 500 µl Puffer AW 1 hinzugegeben und 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert und die Säule wiederum auf eine neue Collection Tube gesetzt. Anschließend werden weitere 500 µl Puffer AW 2 hinzugefügt und 3 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert.

Die Säule wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 200 µl Puffer AE, der auf 90 °C vorgewärmt ist, wird direkt auf die Säule pipettiert, 1 Minute inkubiert und 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert.

4.1.2 PCR Analyse

4.1.2.1 Labormaterialien

Pipetten (Eppendorf) 10 µl, 100 µl, 1000 µl, Filtertips (Greiner bio-one) FT 10 E, 100, 1000, PCR Tubes (Biozym) 0,2 ml, PCR Caps (Bioym) 0,2 ml, Racks für PCR Strips, Minizentrifuge (National Labnet), Nitrile Handschuhe, Elektrophoresekammer (Agagel Maxi Biometra), Electrophoresis Power Supply (Gibco), Lichttisch Mighty Bright (Hofer), Kamera (Polaroid Direct Screen Instant Camera), Electrophoresis hood, Auto-Lipa-Gerät (Innogenetics), Inkubationswanne für Auto-Lipa-Gerät (Innogenetics), Mikrowelle

4.1.2.2 Reagenzien und Testkits

Aqua (B. Braun), Primer MY 09/MY 11 (TIB Molbiol), PCO-Primer (TIB Molbiol), Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 10 x PCR Rxn Buffer (Invitrogen), 50 mM MgCl₂

(Invitrogen), dNTP Set 4 x 25 µmol (Invitrogen), QA-Agarose TM (Qbiogene), GelPilot 100 bp Plus Ladder (Qiagen), 10 x TBE Puffer (Roth), Ethidiumbromid 10 mg/ml (Pierce), INNO-LIPA HPV Genotyping CE (Innogenetics) enthält: Teststreifen, Denaturierungslösung, Hybridisierungslösung, Stringent-Waschlösung, Konjugat 100x konzentriert (wird im Verhältnis 1:100 in Konjugatverdünner verdünnt), Konjugatverdünner, BCIP/NBT-Substrat 100x konzentriert (wird im Verhältnis 1:100 in Substratpuffer verdünnt), Substratpuffer, 5x konzentrierte Spüllösung (wird im Verhältnis 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt), Ableseschablone, Datenblätter, Auswertungstabelle), INNO-LIPA HPV Genotyping CE AMP Kit (Innogenetics) enthält: Primer Mix, Kontroll PCR

4.1.2.3 Durchführung

Zu 40 µl Mastermix, der aus 30,3 µl H₂O, 5 µl PCR-Puffer, 2,5 µl MgCl₂, 1 µl dNTPs, 0,5 µl Primer MY 09, 0,5 µl Primer MY 11 und 0,2 µl Taq Polymerase besteht, werden 10 µl DNA in ein Amplifikationsröhrchen pipettiert.

Die Proben werden in den vorgeheizten und kalibrierten Thermoblock gesetzt, es wird jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt und das Amplifikationsprogramm gestartet.

Das Temperaturprofil wird dabei wie folgt durchlaufen:

1. 9 Minuten 94 °C zur Aktivierung der Taq Polymerase,
2. 1 Minute 25 Sekunden 94 °C zur Denaturierung,
3. 1 Minute 25 Sekunden 60 °C zum Annealing der Primer,
4. 1 Minute 25 Sekunden 72 °C zur Erweiterung der Primer,
5. 5 Minuten 72 °C zur endgültigen Extension.

Schritte 2 - 4 42x.

Für den Nachweis im Agarosegel werden 10 µl Amplifikat mit 1 µl Gelladepuffer versetzt und auf ein 2 prozentiges Agarosegel (in TBE-Puffer), das 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthält, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei 200V. Das Gel wird auf den UV-Lichttisch gelegt und fotografiert.

Alle positiven Proben werden nun mit dem Inno-Lipa Amplifikationskit amplifiziert. Dazu werden 40 µl Mastermix, bestehend aus 5 µl 10 x PCR-Puffer II, 1,5 Units AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 2 mM Mg Cl₂, 200 µM dNTP, 10 µl Primer Mix und 40 µl H₂O, mit 10 µl DNA in ein Amplifikationsröhrchen pipettiert.

Die Proben werden in den vorgeheizten und kalibrierten Thermoblock gesetzt und das Amplifikationsprogramm gestartet.

Das Temperaturprofil wird dabei wie folgt durchlaufen:

1. 9 Minuten 94 °C zur Aktivierung der Platinum Taq DNA Polymerase,
2. 30 Sekunden 94 °C zur Denaturierung,
3. 45 Sekunden 52 °C zum Annealing der Primer,
4. 45 Sekunden 72 °C zur Erweiterung der Primer,
5. 5 Minuten 72 °C zur endgültigen Extension.

Schritte 2-4 40x.

Zur Hybridisierung der Proben werden 10 µl Denaturierungslösung in jede Testwanne pipettiert und 10 µl amplifiziertes biotinyliertes Produkt hinzugegeben. Die Denaturierung schreitet nun für 5 Minuten bei Raumtemperatur fort. Danach werden die Teststreifen in die Wannen gelegt. 2 ml der auf 37 °C vorgewärmten Hybridisierungslösung werden in jede Wanne zu dem denaturierten Amplifikationsprodukt gegeben. Die Inkubationswanne wird in das Auto-Lipa-Gerät gelegt und das Hybridisierungsprogramm gestartet:

Die Hybridisierung findet für 60 Minuten bei 49 °C statt. Anschließend wird 2x mit Stringent Waschlösung für 1 Minute bei 49 °C gewaschen, danach für 30 Minuten bei 49 °C inkubiert.

Alle folgenden Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt:

Für die Farbentwicklung wird jeder Teststreifen zwei Mal für 1 Minute mit 2 ml der verdünnten Spüllösung gewaschen und danach für 30 Minuten in 2 ml Konjugatlösung inkubiert. Jeder Teststreifen wird zwei Mal für eine Minute mit 2 ml verdünnter Spüllösung gespült, anschließend nochmals mit 2 ml Substratpuffer gewaschen und für 30 Minuten in 2 ml Substratlösung inkubiert.

Die Farbentwicklung wird durch zweimaliges Waschen mit 2 ml destilliertem Wasser gestoppt. Danach werden die Streifen aus den Wannen genommen, auf absorbierendes Papier gelegt und später vollständig trocken zum Auswerten auf das Datenblatt geklebt.

5 Ergebnisse

Die Studie beruht auf Daten von 4000 Patientinnen, die sich im Zeitraum von März 2006 bis Februar 2008 einem HPV Screening unterzogen haben. Die Untersuchungen wurden im Rahmen der routinemäßigen Krebsvorsorgeuntersuchung als Wahlleistung oder bei Selbstzahlerinnen in insgesamt 29 gynäkologischen Arztpraxen durchgeführt.

Von den 4000 untersuchten Patientinnen war die Jüngste 14 und die Älteste 77 Jahre alt. Das gesamte Patientenkollektiv wurde in 9 Gruppen unterteilt: <20, 20-24, 25-29, 30-34, 35-39, 40-44, 45-49, 50-54 und >54 (Tab. 1).

Alter	Anzahl	Anteil
<20	113	2,8 %
20-24	275	6,9 %
25-29	370	9,3 %
30-34	461	11,5 %
35-39	655	16,4 %
40-44	727	18,2 %
45-49	461	11,5 %
50-54	369	9,2 %
>54	569	14,2 %
Total	4000	100 %

Tabelle 1: Anzahl und prozentualer Anteil der Patientinnen in den einzelnen Altersgruppen.

Die Gruppe der unter 20-Jährigen war mit 113 Teilnehmerinnen die kleinste. Die Altersgruppe der Frauen über 54 erstreckte sich bis zum 77. Lebensjahr. Da ab diesem Alter die Prävalenz von HPV geringer war, wurde sie zusammengefasst. In dem verwendeten Testsystem konnten 11 HPV-lr Subtypen und 14 HPV-hr Subtypen nachgewiesen werden. Zu den HPV-lr Subtypen gehören: 53, 70, 54, 6, 44, 40, 74, 43, 42, 11 und 61. Zu den HPV-hr Subtypen gehören: 16, 31, 66, 51, 45, 18, 68, 58, 33, 52, 39, 59, 56 und 35.

Insgesamt hatten von den 4000 Teilnehmerinnen 2996 (74,9 %) Frauen einen negativen HPV Nachweis. Bei 1004 (25,1 %) der Frauen war ein Amplifikat nach Einsatz der Konsensussonde nachweisbar und damit bestand zumindest der Verdacht eines positiven HPV Nachweises. Dieser Verdacht konnte bei 819 (20,5 %) Patientinnen durch eine Zuordnung in der Hybridisierung zu einem oder auch mehr als einem gleichzeitig vorliegenden HPV Typen bestätigt werden. In den Ergebnissen fanden sich Infektionen mit nur einem HPV-hr oder -lr

Typen, oder es lagen kombinierte Infektionen mit zwei oder mehr HPV-hr oder -lr Typen vor, oder aber als Mischinfektionen bezeichnete Kombinationen mit verschiedenen HPV-hr und -lr Typen. Unter Berücksichtigung der 170 Frauen mit sogenannten Mischinfektionen von HPV-hr und lr und 185 Frauen mit nicht klassifizierbaren HPV Typen fand sich folgende Verteilung der HPV Infektionen (Abb. 1).

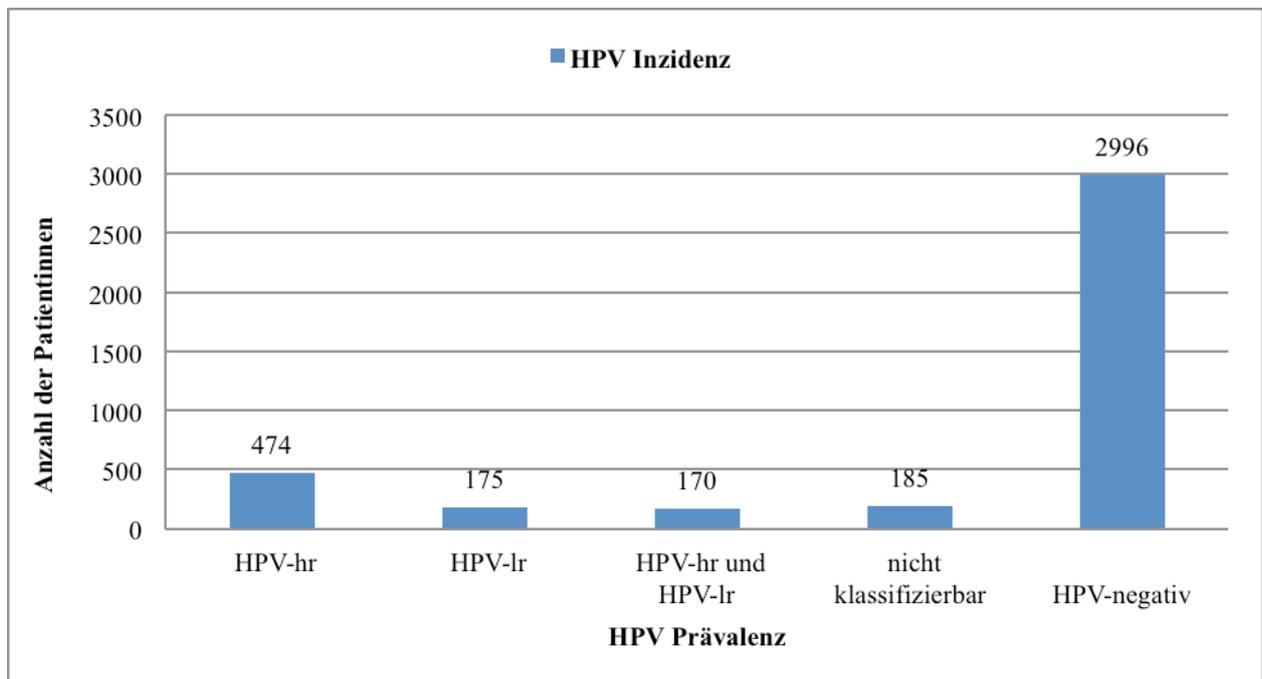


Abbildung 1: Typisierung der HPV positiven Patientinnen unter Einbeziehung der Mischinfektionen. HPV-hr und HPV-lr sind als mehrfache oder einzelne Infektionen berücksichtigt.

Bei 474 (11,9 %) Frauen fanden sich ein oder mehrere HPV-hr Typen. Bei 175 Frauen (4,4 %) fanden sich ein oder mehr HPV-lr Subtypen und 170 Frauen (4,3 %) hatten zusätzlich Mischinfektionen mit beiden Typen. Bei 185 (4,6 %) der Frauen mit einem Amplifikat konnte in der Hybridisierung kein Subtyp identifiziert werden. Diese Proben wurden als fraglicher Nachweis einer HPV Infektion gewertet.

Die Verteilung der HPV Befunde zeigt Tabelle 2a. Evident ist, dass der Anteil von hr Infektionen verglichen mit lr Infektionen fast doppelt so hoch ist. Bezogen auf die Summe der Frauen mit identifizierten Typen (n=819) wird die Bedeutung der Mischinfektionen mit hr und lr Typen, aber auch der Mehrfachinfektionen deutlich, die zusammen 36,3 % der Frauen mit typisierter HPV Infektion betreffen. Dem gleichzeitigen Vorliegen von Misch- und Mehrfachinfektionen wird in der Tabelle 2b Rechnung getragen, in der die Verteilung separat aufgeschlüsselt wird.

N=4000	N	%		n=819	
HPV neg	2996	74,9			
HPV nk	185	4,6	Odds Ratio	%	Odds Ratio
HPV-hr und/oder -lr Infizierte	819	20,5		100	
HPV-hr Infizierte	644	16,1	2,0 (1,8-2,3)*	78,6	5,0 (4,0-6,3)*
HPV-lr Infizierte	345	8,6		42,1	
HPV-hr = 1	470	11,8	1,6 (1,4-1,9)*	57	2,3 (1,9-2,8)*
HPV-lr = 1	151	3,8		36,6	
HPV-hr ≥ 2	174	4,4	4 (2,9-5,6)*	21,2	2,5 (1,7-3,5)*
HPV-lr ≥ 2	45	1,1		5,5	
HPV-hr+lr Mischinfizierte	170	4,3	0,8 (0,6-0,9)	20,8	0,7 (0,5-0,9)
HPV Mehrfachinfizierte	219	5,5	p=0,005	26,7	p=0,005
Misch- und Kombiinfizierte	297	7,4		36,3	

Tabelle 2a: Anteil der Mehrfachinfektionen und der Mischinfektionen im Studienkollektiv. *p<0.000

	HPV-lr = 0	HPV-lr =1	HPV-lr ≥ 2	HPV +
HPV-hr = 0	3181	151	24	175
HPV-hr =1	371	88	11	470
HPV-hr ≥ 2	103	61	10	174
HPV +	474	300	45	819

Tabelle 2b: Verteilung der HPV Typen als Mischinfektionen zwischen HPV-hr und -lr (rot) und Anteil der Mehrfachinfektionen durch kombinierte HPV-hr oder HPV-lr Typen (jeweils blau).

Insgesamt konnte bei 644 Frauen das Vorliegen von einem (470) und zwei oder mehr HPV-hr Typen (174) nachgewiesen werden. Von den insgesamt 345 erkannten Infektionen mit HPV-lr Typen war bei 300 Frauen nur ein Typ und bei 45 Frauen mehr als ein Typ nachweisbar. Infektionen mit HPV-hr Subtypen waren in der Population nicht nur fast doppelt so häufig nachzuweisen, sondern es fand sich auch ein signifikant höherer Anteil von Mehrfachinfektionen mit hr Typen, selbst unter Berücksichtigung der tatsächlichen Prävalenzen des Risikotyps bei den Infizierten. In der Hälfte der Fälle einer nachgewiesenen HPV-lr Infektion lag gleichzeitig eine HPV-hr Infektion vor. Entsprechend war bei HPV-hr Infektionen nur in 26,4 % eine gleichzeitige lr Infektion zu finden.

Berücksichtigt man den sich allerdings erheblich überschneidenden Anteil von Misch- und Mehrfachinfektionen, so sind Mehrfachinfektionen durch die hohe Prävalenz der hr Typen häufiger. Innerhalb der Mischinfektionen war allerdings der Anteil von hr Mehrfachinfektionen mit 36 % deutlich häufiger, als mit 22 % unter den 474 lr Infektionen.

5.1 Verteilung der HPV-hr und -lr Typen in der Studienpopulation

Bei der Untersuchung der Proben auf HPV-hr Typen konnte bei 644 Frauen das Vorliegen von ein (470) oder auch mehr HPV-hr (174) Typen nachgewiesen werden. Insgesamt waren bei diesen Frauen 880 HPV-hr Typen nachzuweisen. Das heißt, 410 HPV-hr Typen verteilten sich auf n=174 Frauen, die mit zwei oder mehr im Mittelwert 2,37 HPV-hr Typen infiziert waren.

Von den 220 Frauen mit einer HPV 16 Infektion hatten 75 (25 %) auch Infektionen mit anderen HPV-hr oder -lr Typen. Dies wurde auch bei Infektionen mit HPV 18, HPV 31 und allen anderen HPV-hr Typen gezeigt (Tab. 3).

Zur Beantwortung der Frage, ob die Verteilung der Anteile von hr Typen durch Mehrfachinfektionen beeinflusst wird, wurden Einzelinfektionen und alle Infektionen mit Mehrfachinfektionen gegenübergestellt. Dazu wurden die Mehrfachinfektionen auf den am häufigsten vorliegenden Typ 16 bezogen (Tab. 4) und bereits berücksichtigte Typen stufenweise abgezogen. Bei den 644 Frauen mit HPV-hr Infektion wurden insgesamt 880 Infektionen festgestellt, da jetzt auch mehrfache Infektionen gewertet wurden. Damit lagen insgesamt 137 % HPV Infektionen vor. Im Vergleich erhöhten sich die Anteile der jeweiligen HPV-hr Typen in zwar unterschiedlichen Ausmaßen zwischen 25 bis 55 %, hatten aber auf die Verteilung selbst keinen signifikanten Einfluss. Das heißt, es konnten keine Typen erkannt werden, die besonders häufig in Kombinationen vorkamen. Als einziger HPV Typ war HPV 16 als häufigster nachgewiesener HPV Typ in Mehrfachinfektionen sogar signifikant weniger vertreten. Ansonsten wurde die Prävalenz von HPV-hr Typen durch Mehrfachinfektionen nicht beeinflusst.

Verteilung der HPV-hr Typen bei Einzelinfekten			Verteilung aller HPV-hr Typen			p-Wert
Typ	N	%	Typ	N	%	
16	146	31,1	16	220	34	0.02
66	50	10,6	31	103	16	ns
31	47	10,0	66	87	14	ns
58	34	7,1	51	75	12	ns
45	33	7,0	45	60	9	ns
18	28	6,0	18	55	9	ns
51	28	6,0	68	54	8	ns
68	26	5,4	58	53	8	ns
33	25	5,3	33	49	8	ns
52	20	4,3	52	43	7	ns
39	13	2,7	39	32	5	ns
59	10	2,1	59	28	4	ns
56	8	1,7	56	15	2	ns
35	2	0,43	35	6	1	ns
	470	100 %		880	137 %	

Tabelle 3: HPV-hr Subtyp Verteilung bei Einzelinfekten und bei Wertung auch der mehrfachen Infektionen mit HPV-hr Typen (ns = nicht signifikant).

220 (34 %) Patientinnen hatten einen positiven Nachweis auf HPV-hr Subtyp 16, welcher bei weitem das häufigste Vorkommen hatte. 103 (16 %) Patientinnen waren HPV-hr Subtyp 31, 74 (14 %) HPV-hr Subtyp 66, 75 (12 %) HPV-hr Subtyp 51, 60 (9 %) HPV-hr Subtyp 45, 55 (9 %) HPV-hr Subtyp 18, 54 (8 %) HPV-hr Subtyp 68, 53 (8 %) HPV-hr Subtyp 58, 49 (8 %) HPV-hr Subtyp 33, 43 (7 %) HPV-hr Subtyp 52, 32 (5 %) HPV-hr Subtyp 39, 28 (4 %) HPV-hr Subtyp 59, 15 (2 %) HPV-hr Subtyp 56 und 6 (1 %) HPV-hr Subtyp 35 positiv (Abb. 2).

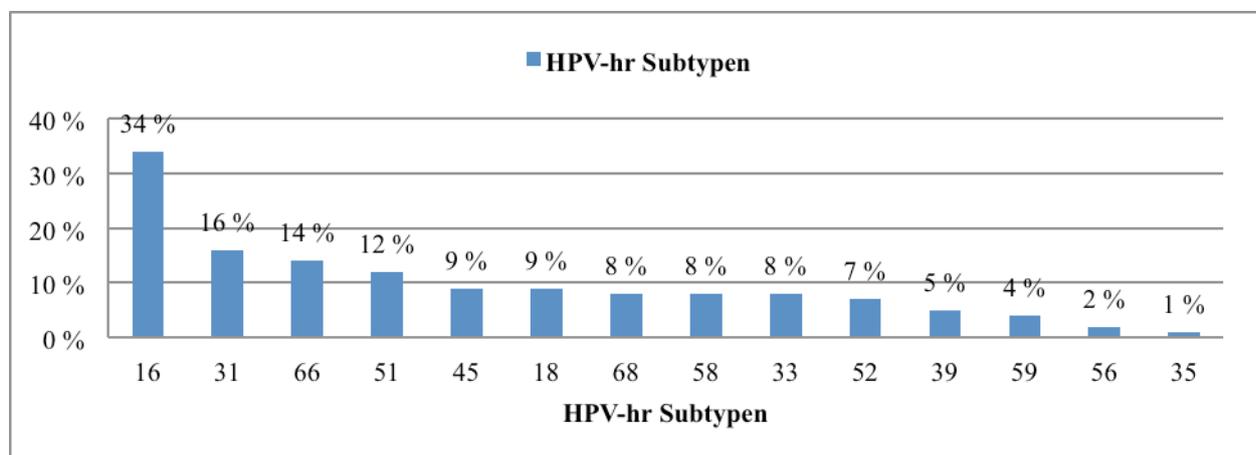


Abbildung 2: HPV-hr Subtypen nach Häufigkeit und prozentuellem Anteil graphisch dargestellt.

Ähnlich verhielt es sich auch bei der Verteilung der nachgewiesenen HPV-Ir Typen sowie bei deren prozentualen Anteilen, welche der Tabelle 4 sowie der Abbildung 3 zu entnehmen sind. Insgesamt konnten bei 345 Frauen (8,6 %) HPV-Ir Typen nachgewiesen werden. Von diesen hatten 45 (13 %) der Untersuchten zwei oder mehr Infektionen mit unterschiedlichen HPV-Ir Typen. Das heißt 13 % der nachgewiesenen HPV-Ir Typen sind Mehrfachinfektionen geschuldet.

Verteilung der HPV-Ir Typen bei Einzelinfekten			Verteilung aller HPV-Ir Typen			p-Wert
Typ	N	%	Typ	N	%	
53	101	29,1	53	108	31	ns
70	69	20,1	70	80	23	ns
54	69	20,1	54	79	23	ns
6	52	15,1	6	59	17	ns
40	15	4,2	44	17	5	ns
44	10	3	40	16	5	ns
43	10	3	74	16	5	ns
74	8	2,3	43	10	2	ns
42	5	1,3	42	8	2	ns
11	5	1,3	11	5	1	ns
61	0	0	61	5	1	-
	345	100		399	115	

Tabelle 4: HPV-Ir Subtypen nach Häufigkeit und prozentualen Anteil.

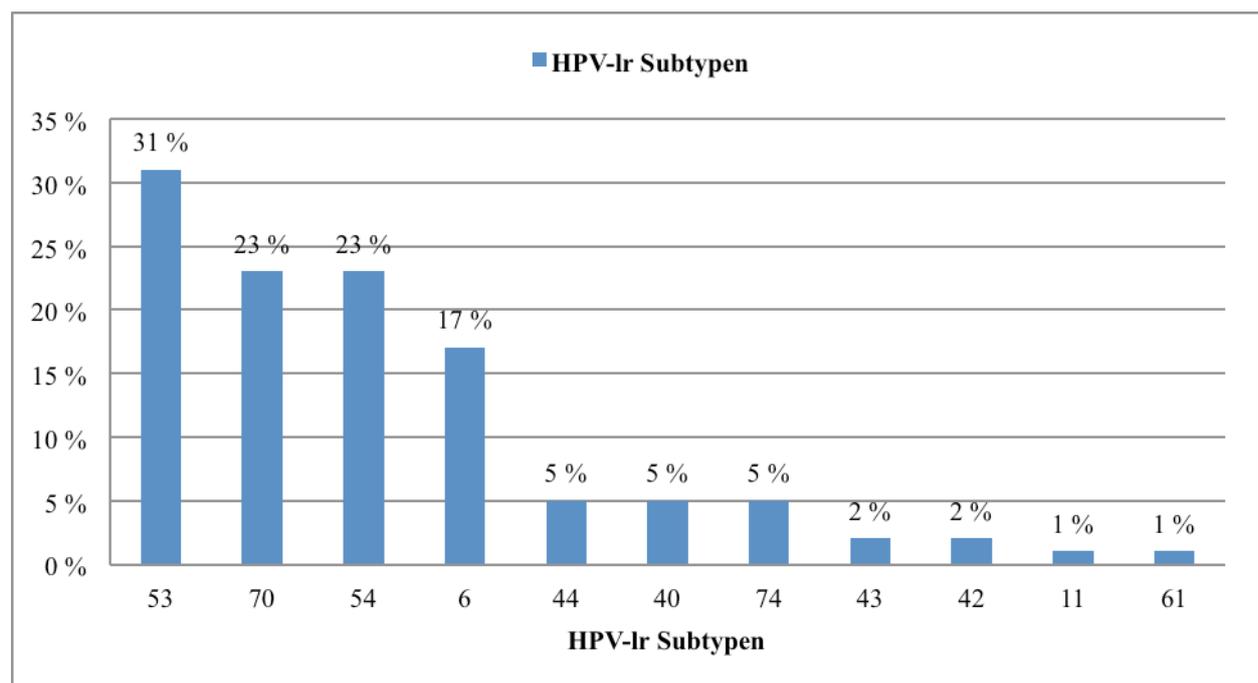


Abbildung 3: HPV-Ir Subtypen nach Häufigkeit und prozentualen Anteil graphisch dargestellt.

Dies berücksichtigend wurde bei 108 (31 %) Patientinnen HPV-Ir Subtyp 53 nachgewiesen. Dieser war damit der häufigste HPV-Ir Typ. 80 (23 %) Patientinnen hatten HPV-Ir Subtyp 70. 79 Frauen (23 %) waren mit HPV-Ir Subtyp 54 infiziert. 59 Frauen (17 %) hatten HPV-Ir Subtyp 6, 17 (5 %) HPV-Ir Subtyp 44, 16 (5 %) HPV-Ir Subtyp 40, 16 (5 %) HPV-Ir Subtyp 74, 10 (2 %) HPV-Ir Subtyp 43, 8 (2 %) HPV-Ir Subtyp 42, 5 (1 %) HPV-Ir Subtyp 11 und eine (1 %) HPV-Ir Subtyp 61. Bezogen auf die Population der Untersuchten waren die für Condylomata acuminata verantwortlich gemachten HPV-Ir Typen HPV 6 mit einer Prävalenz von 1,5 % und Subtyp 11 mit einer Prävalenz von 0,13 % vertreten (Abb. 3).

5.2 Altersverteilung

Bei der Altersverteilung von Frauen, die einen ausschließlichen HPV-Ir Nachweis haben, werden gerade in jungen Jahren <20 die höchsten Prävalenzen (6,2 %) gefunden. Diese fallen kontinuierlich bis zur Gruppe der 30 bis 34-Jährigen ab, um bei Frauen zwischen 35 und 39 Jahren erneut auf 5,67 % anzusteigen. Mit zunehmendem Alter wird dann die Infektion mit HPV-Ir Typen seltener beobachtet. In der Altersgruppe der >54-Jährigen sind nur noch 2,1 % betroffen (Abb. 4).

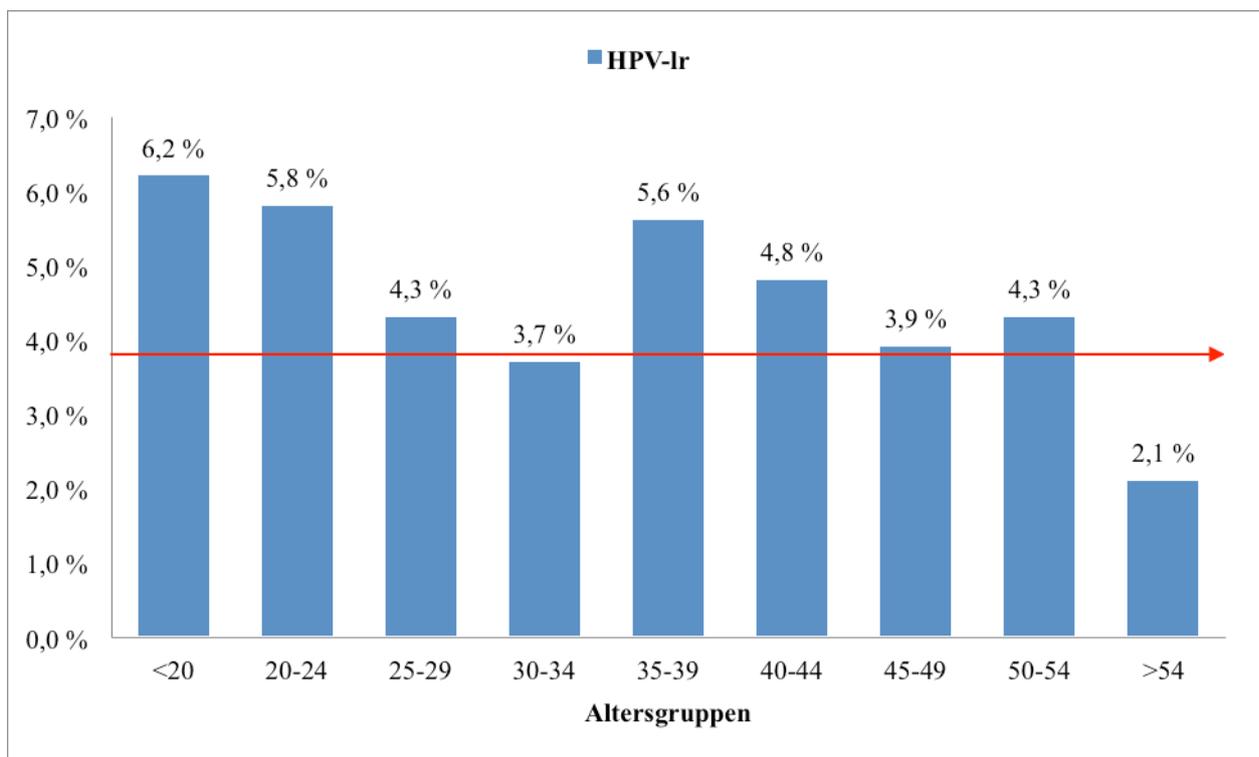


Abbildung 4: Verteilung der Prävalenzen von HPV-Ir Infektionen ohne Mischinfektionen auf die Altersgruppen. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 3,8 % (roter Pfeil).

Im Vergleich steigt die Prävalenz der HPV-Ir positiven Frauen in den frühen Zwanzigern kontinuierlich bis zur Gruppe der 25 bis 29-Jährigen auf 18,2 % an. Mit steigendem Alter fällt die Prävalenz der HPV-Ir Typen bis zum 49. Lebensjahr auf 6,9 % ab. Allerdings konnte bei den in dieser Studie untersuchten über 54-Jährigen eine leicht erhöhte Prävalenz beobachtet werden (Abb. 5). Frauen, die eine HPV-Ir und gleichzeitig eine HPV-Ir Infektion hatten (Abb. 6) zeigten gerade bei 20 bis 24-Jährigen die höchste Prävalenz. Auch hier fand sich mit zunehmendem Alter ein Abfall der Prävalenz.

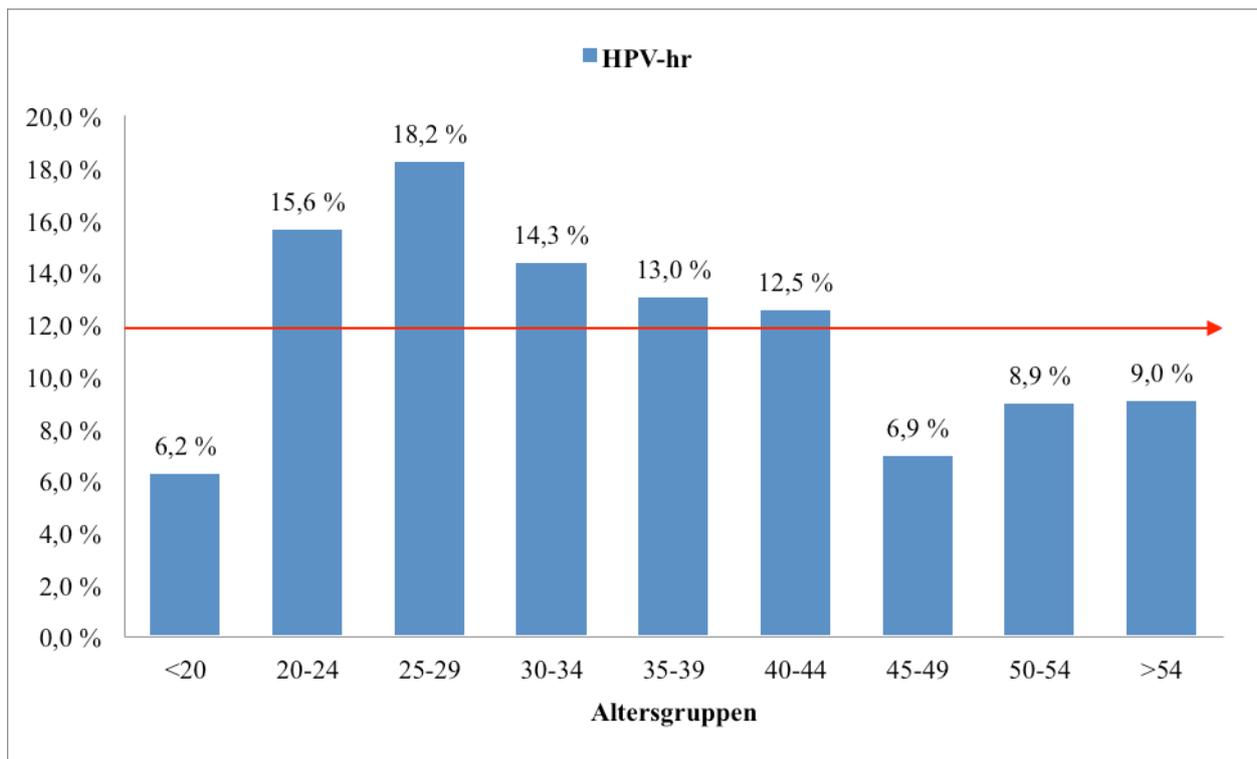


Abbildung 5: Verteilung der Prävalenzen von HPV-hr Infektionen ohne Mischinfektionen auf die Altersgruppen. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 11,8 % (roter Pfeil).

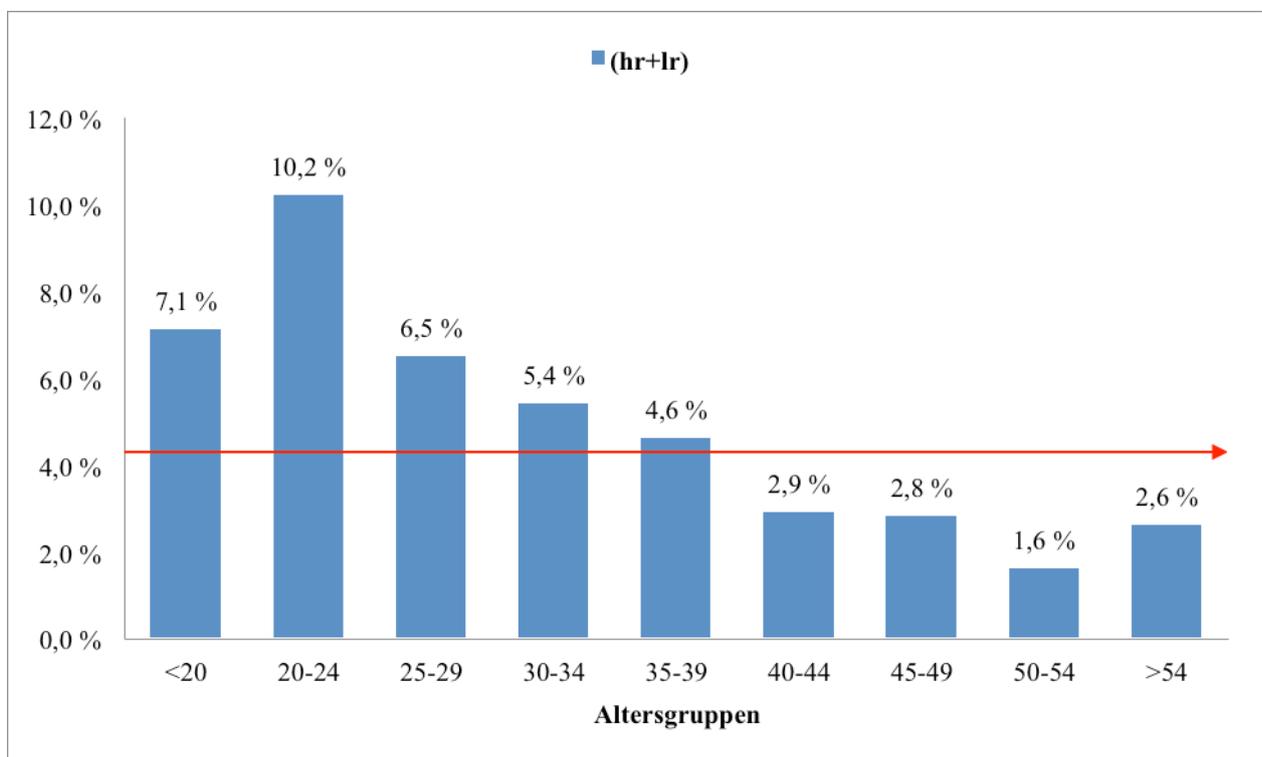


Abbildung 6: Verteilung der Prävalenzen von Mischinfektionen (hr+lr) auf die Altersgruppen. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 4,3 % (roter Pfeil).

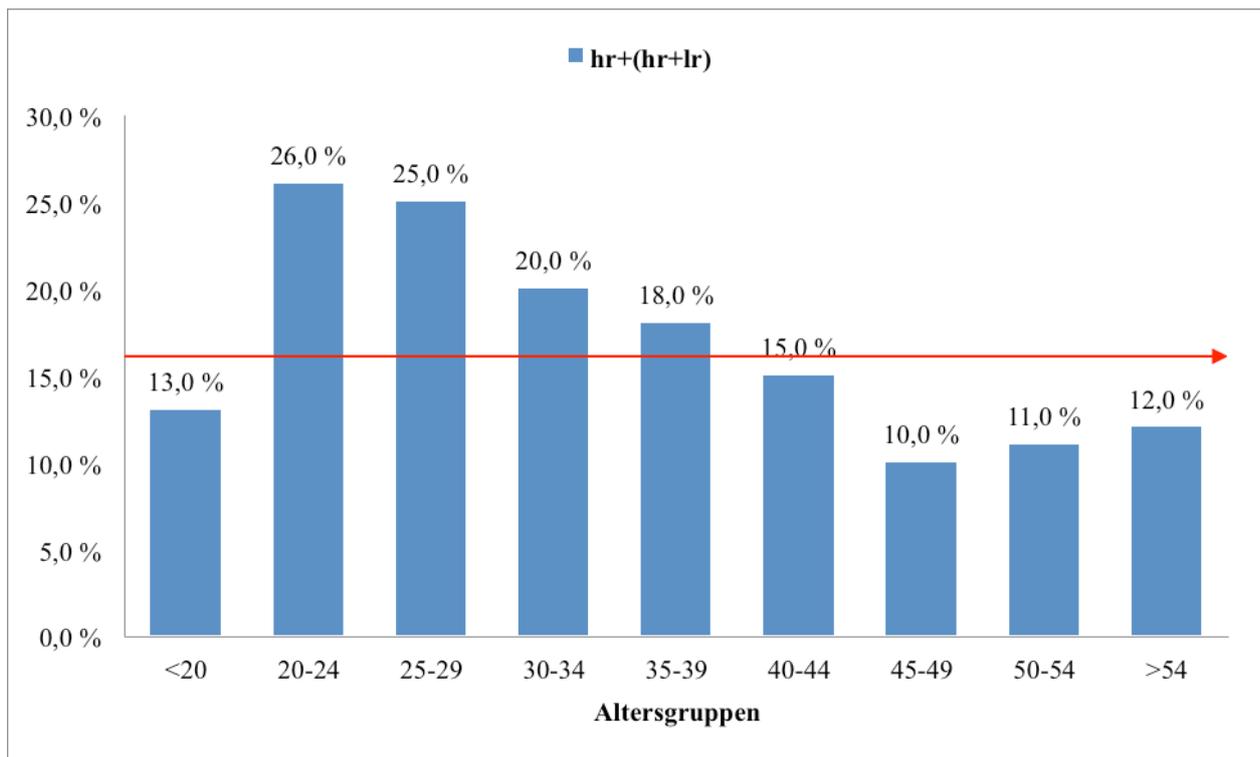


Abbildung 7: Verteilung der Prävalenzen von HPV-hr positiven und Mischinfektionen (hr+lr) auf die Altersgruppen. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 16,1 % (roter Pfeil).

Unter dem sich hier abzeichnenden Trend, dass HPV-lr Typen einen früheren Prävalenzpeak zeigen als HPV-hr Infektionen, verwundert es nicht, dass die Prävalenz aller HPV-hr Typen, d.h. aller Infektionen an denen HPV-hr Typen beteiligt sind, eine Verschiebung der höchsten Prävalenz von 26 % auf die Gruppe der 20 bis 24-Jährigen ergab. Die HPV-hr und HPV-hr und -lr Infizierten zeigten ansonsten eine vergleichbare Senkung der Prävalenz zu höheren Altersgruppen hin (Abb. 7).

Damit wurde die Untersuchung der nicht klassifizierbaren HPV Nachweise interessant. Denn mit einer altersunabhängigen Durchschnittsprävalenz von 4,6 % hatten diese durchaus einen beachtlichen Anteil an den HPV Infektionen in der Population. Die Altersverteilung der nk HPV verhält sich aber im Vergleich zu den HPV-lr und -hr Typen anders. Vergleichbar zu den hr Typen stieg die Prävalenz in den frühen Altersgruppen an, erreichte aber erst in der Gruppe der 30 bis 34-Jährigen seine Peakprävalenz von 6,5 % (Abb. 8). Allerdings verblieben die Altersgruppenprävalenzen auch mit steigendem Alter auf einem konstant erhöhten Niveau.

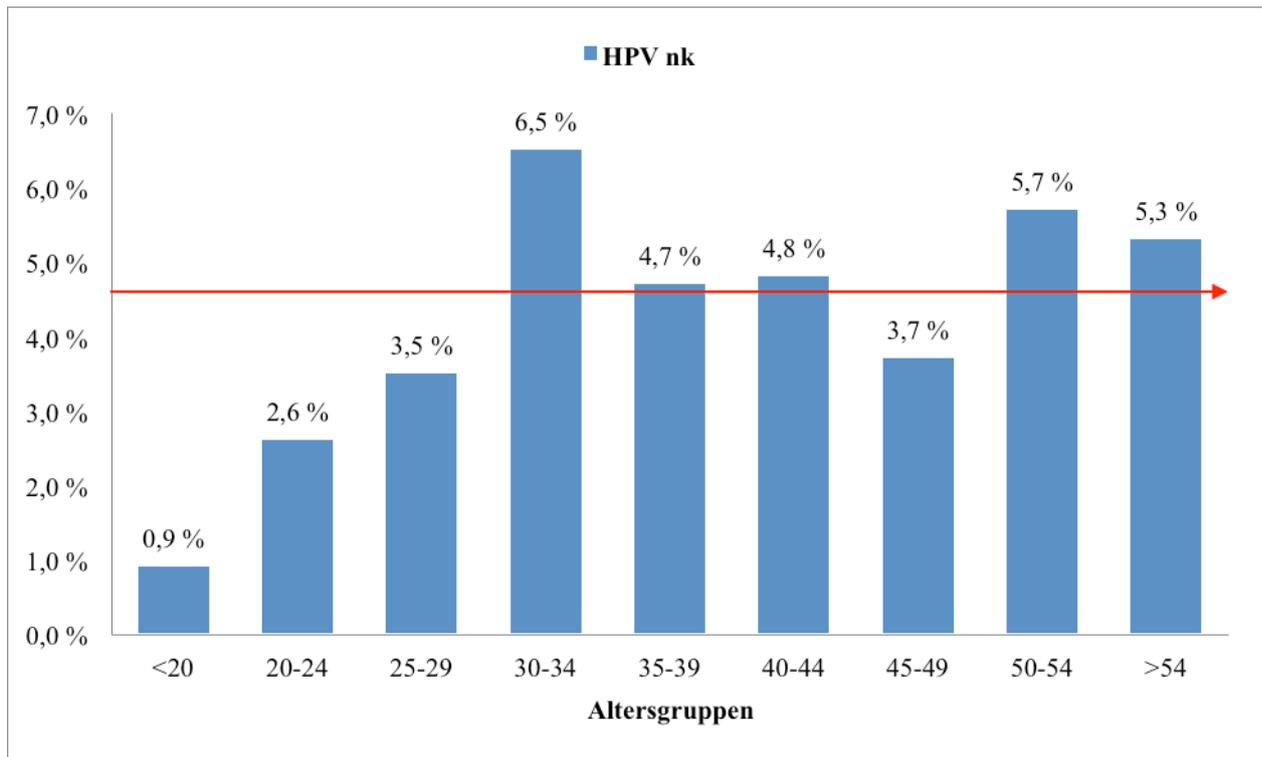


Abbildung 8: Verteilung der Prävalenzen von nicht klassifizierbaren HPV Infektionen auf die Altersgruppen. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 4,6 % (roter Pfeil).

Somit unterscheiden sich die altersabhängigen Entwicklungen der nicht klassifizierbaren Typen sowohl von den HPV-lr Typen als auch von den HPV-hr Typen. Lr aber auch hr Typen zeigen im linearen Trend eine Abnahme der Prävalenzen mit zunehmender Altersgruppe. Dabei verschieben sich die Peakprävalenzen: Die höchsten Prävalenzen bei lr Typen zeigten sich bei den unter 20-Jährigen und verschoben sich bei Frauen mit einem hohen Anteil von hr Infektionen auf mittlere Altersgruppen bis 30 Jahre (Abb. 9). Bei den nicht klassifizierbaren HPV Infektionen zeigte sich beim linearen Vergleich der Altersentwicklung in allen verfügbaren Tests (Pearson etc.) eine von den jungen Jahrgängen ansteigende Entwicklung der Prävalenz, die sich signifikant von den nachgewiesenen Virustypen unterschied (Abb. 10). Hier stellt sich die Frage, ob es sich nicht um inkomplette Virus DNA oder DNA Fragmente handelt, die kein aktives oder infektionstüchtiges Virus repräsentieren.

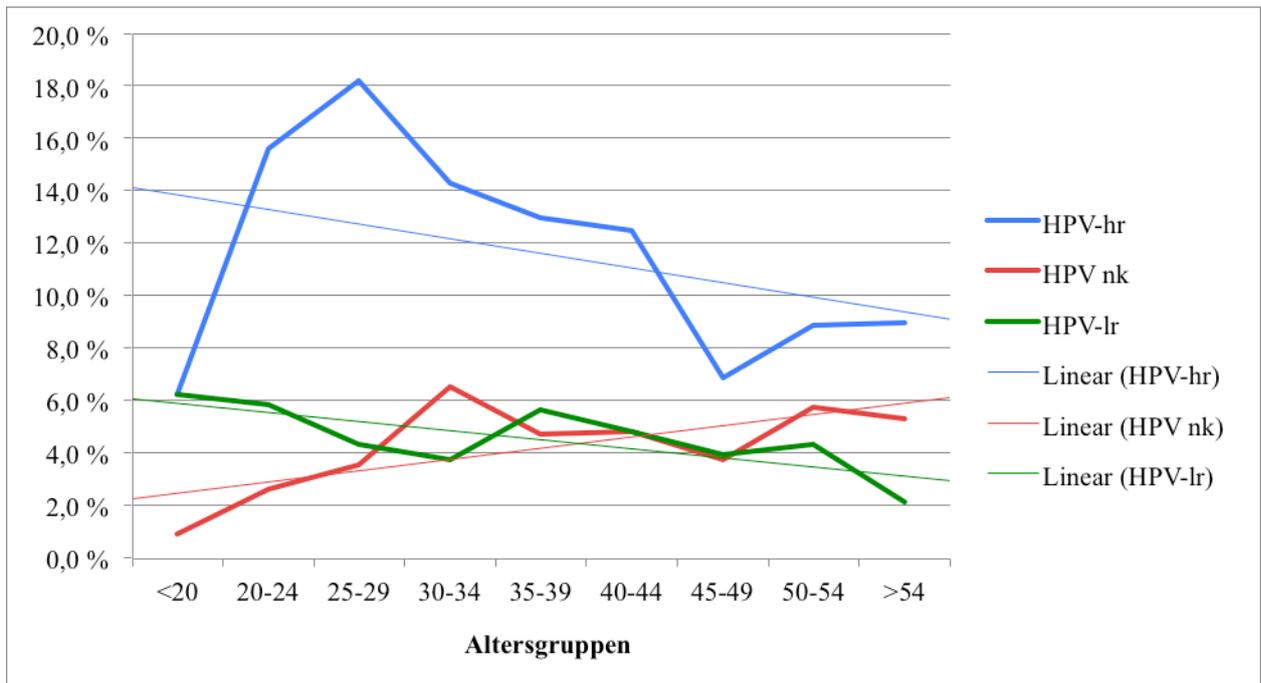


Abbildung 9: Prävalenz der HPV-hr Typen inklusive der hr Typen, die als Mischinfektionen (hr+lr) gefunden wurden sowie der HPV-lr Infektionen und der linear prognostizierbare Trend der Altersentwicklung.

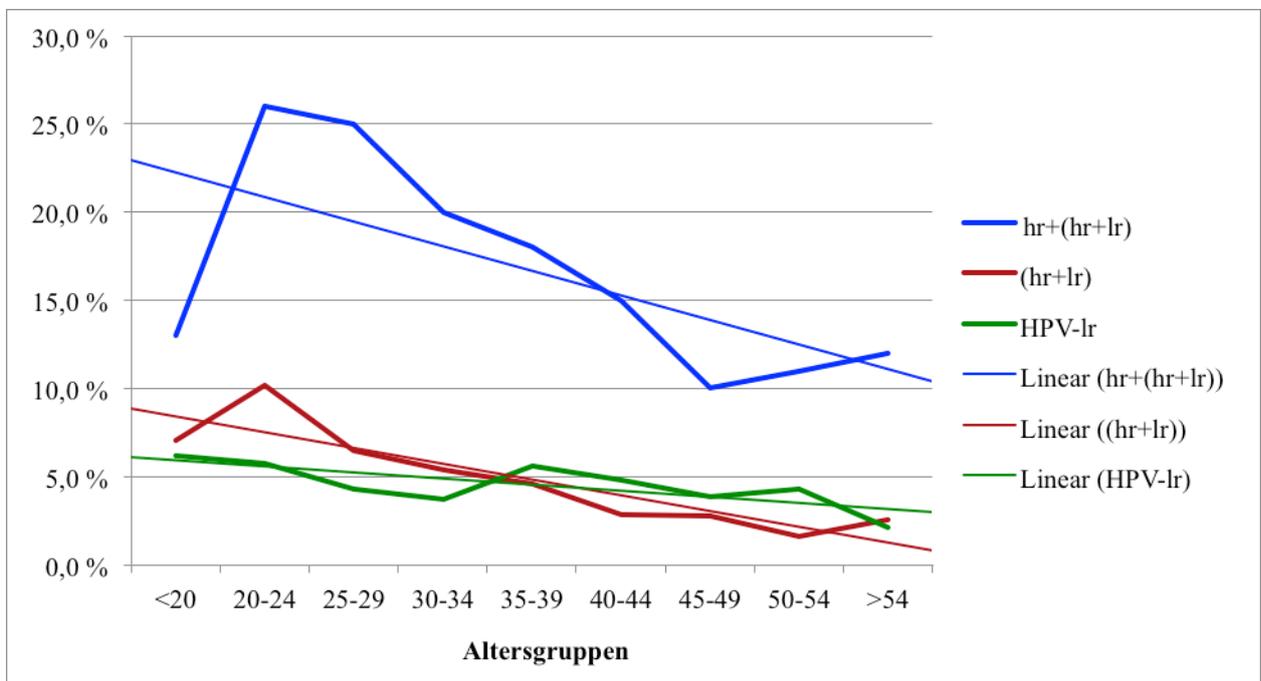


Abbildung 10: Prävalenz der HPV-hr und -lr Typen sowie der nicht klassifizierbaren Typen und der linear prognostizierbare Trend der Altersentwicklung.

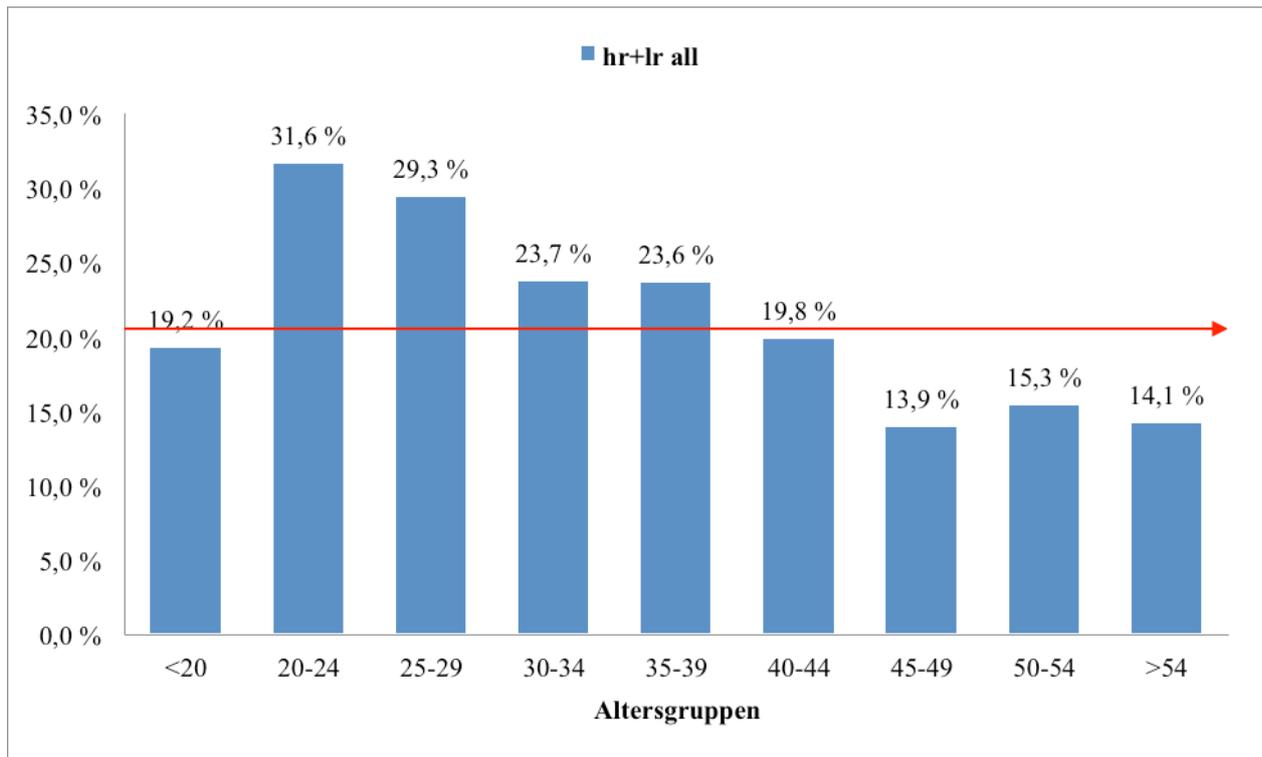


Abbildung 11: Verteilung der Prävalenzen aller HPV Typen inklusive Misch- und Mehrfachinfektionen auf die Altersgruppen. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 20,5 % (roter Pfeil).

Betrachtet man nun die Altersverteilung aller HPV Infektionen in ihrer Gesamtheit, so zeigt sich ein deutlicher Gipfel von 31,6 % bei den 20 bis 24-Jährigen. Die Prävalenz fällt nur langsam auf 29,3 % bei den 25 bis 29-Jährigen ab und bleibt dann bis zu einem Alter von 39 Jahren mit 23,6 % auf einem konstanten Niveau. Erst ab einem Alter von 40 Jahren pendelt sich die Prävalenz wieder auf 19 % ein, um dann in den höheren Altersgruppen weiter abzufallen (Abb. 11).

5.3 Verteilung der Misch- und Mehrfachinfektionen im Hinblick auf die existierenden Impfungen

Aufgrund der existierenden Impfungen gegen HPV-Ir Subtypen 6 und 11 sowie der HPV-hr Subtypen 16 und 18, wurden diese auch in Hinblick auf eventuelle Kreuzreaktionen gesondert untersucht. Von den 4000 Patientinnen hatten 59 (1,5 %) Patientinnen einen positiven Nachweis auf HPV-Ir Subtyp 6. Bei genauer Betrachtung hatten sogar nur 33 (0,83 %) Patientinnen eine Einzelinfektion. Die übrigen 26 (0,67 %) Patientinnen hatten eine Mischinfektion mit einem HPV-hr Subtypen. Davon waren 4 (0,1 %) mit HPV-Ir Subtyp 6 und HPV-hr Subtyp 16 infiziert. Eine (0,03 %) der Patientinnen war mit HPV-Ir Subtyp 6 und HPV-hr Subtyp 18 infiziert. Keine der 4000 Patientinnen hatte eine gleichzeitige Mischinfektion mit den HPV-hr Subtypen 16 und 18. Zusammenfassend waren es 5 (0,13 %) Patientinnen, die HPV-Ir Subtyp 6 in Kombination mit einem impfsensiblen HPV-hr Subtypen infiziert waren (Abb. 12).

Weitaus geringer fallen die Zahlen der HPV-Ir Subtyp 11 infizierten Patientinnen aus. Bei insgesamt 5 (0,13 %) Infektionen war nur eine (0,03 %) Mischinfektion in Kombination mit dem HPV-hr Subtypen 53 vorhanden. Eine Mischinfektion mit den HPV-hr Subtypen 16 oder 18 war nicht vertreten. Die übrigen 4 (0,1 %) HPV-Ir Subtyp 11 Infektionen waren Einzelinfektionen (Abb. 12).

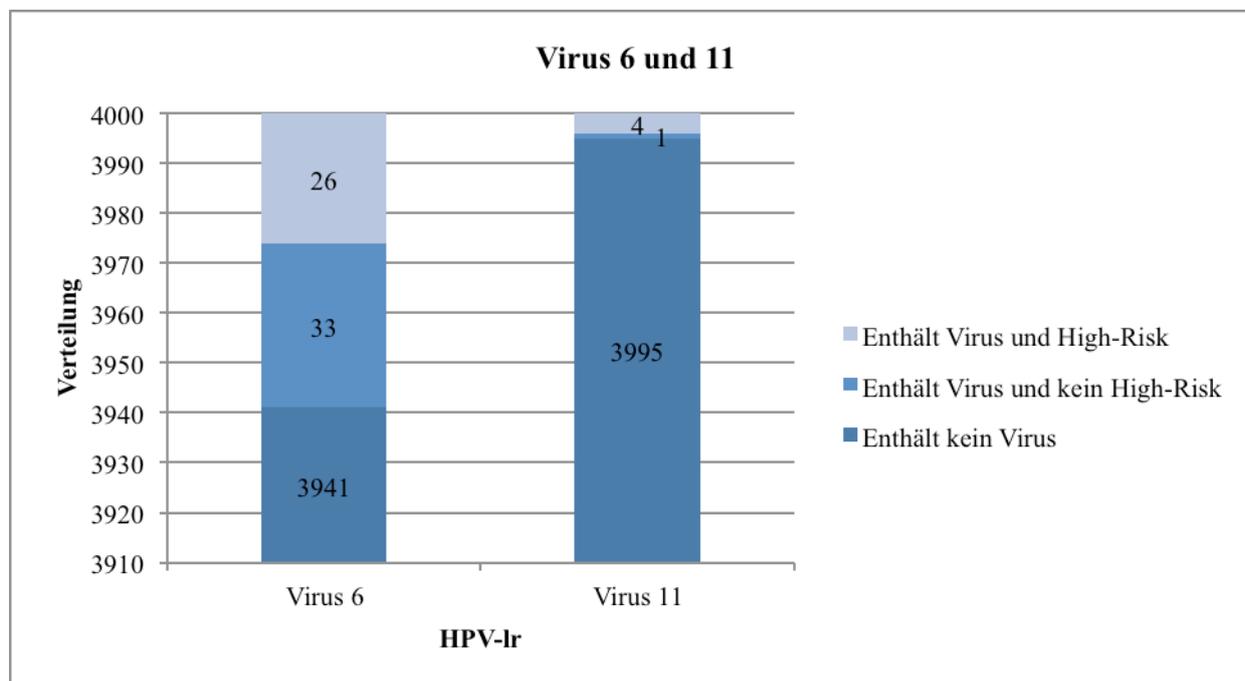


Abbildung 12: Häufigkeit der Einzel- und Mischinfektionen für HPV-Ir Subtyp 6 und 11. Der Übersichtlichkeit halber Skalierung auf der y-Achse erst bei 3910 begonnen.

Bei den impfrelevanten HPV-hr Subtypen 16 und 18 wurden folgende Ergebnisse ermittelt: Insgesamt waren 220 (5,5 %) Patientinnen HPV-hr Subtyp 16 positiv. Davon waren 173 (4,3 %) Einzelinfektionen oder Infektionen mit einem anderen nicht impfrelevanten HPV-hr Subtypen. 47 (1,2 %) Patientinnen hatten eine Mischinfektion mit einem HPV-hr Subtypen. 8 (0,2 %) Patientinnen hatten einen positiven Kombinationsnachweis mit HPV-hr Subtyp 16 und 18. 5 (0,13 %) Patientinnen hatten zusätzlich einen Nachweis auf einen HPV-hr Subtypen. Folglich waren 13 (0,33 %) Patientinnen auf sowohl HPV-hr Subtyp 16 als auch 18 positiv getestet (Abb. 13).

Von den untersuchten Patientinnen waren 55 (1,4 %) HPV-hr Subtyp 18 positiv. Davon hatten 36 (0,9 %) eine Einzelinfektion oder eine Infektion mit einem weiteren nicht impfrelevanten HPV-hr Subtypen. 19 (0,5 %) Patientinnen hatten eine Mischinfektion mit einem HPV-hr Subtypen (Abb. 13).

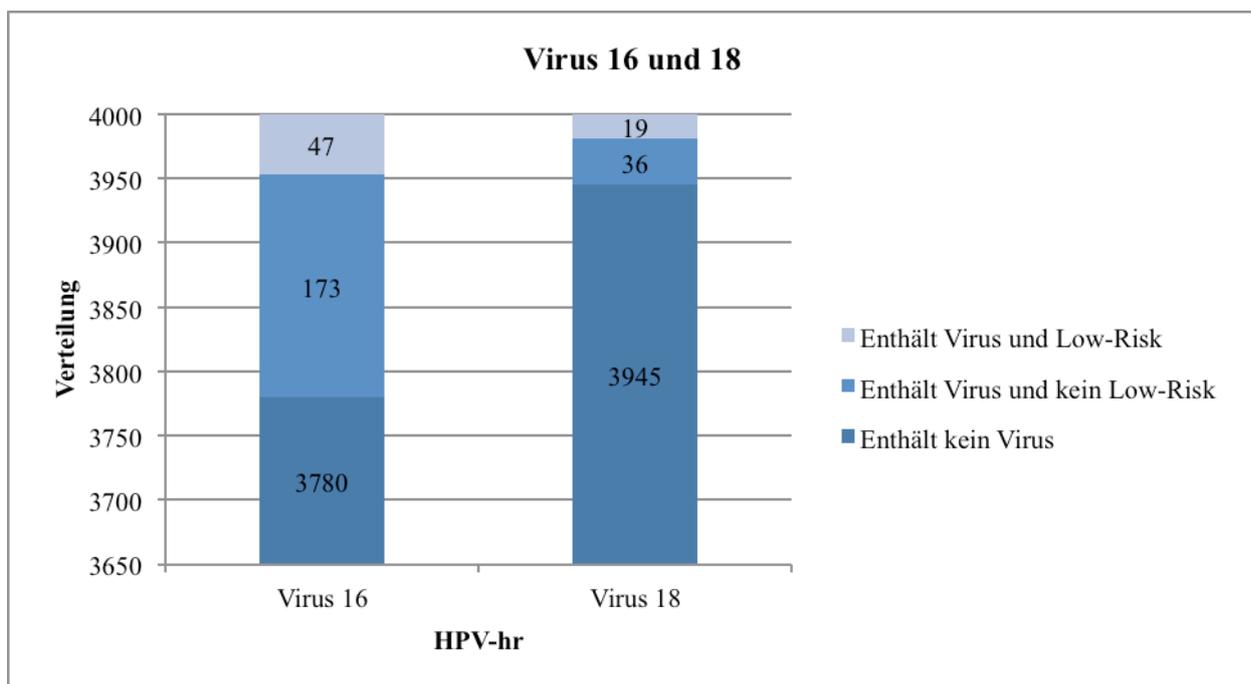


Abbildung 13: Häufigkeit der Einzel- und Mischinfektionen für HPV-hr Subtyp 16 und 18.
Der Übersichtlichkeit halber Skalierung auf der y-Achse erst bei 3650 begonnen.

5.4 Altersverteilung der Prävalenzen für einzelne Subtypen

Betrachtet man die Altersverteilung von HPV 16 gesondert, so fällt sofort der Gipfel zwischen dem 20. und 24. Lebensjahr auf (11,3 % bzw. 10,8 %). Ab dem 30. Lebensjahr kommt es zu einem rasanten Abfall der HPV Subtyp 16 Infektionen auf etwa die Hälfte (5,4 %). Es zeigt sich ein erneuter kleiner Gipfel bei den 35 bis 40-Jährigen Frauen. Danach pendelt sich die HPV Subtyp 16 Inzidenz bei unter 4 % ein. Ab einem Alter von 55 Jahren fällt sie sogar auf unter 2 % (Abb. 14).

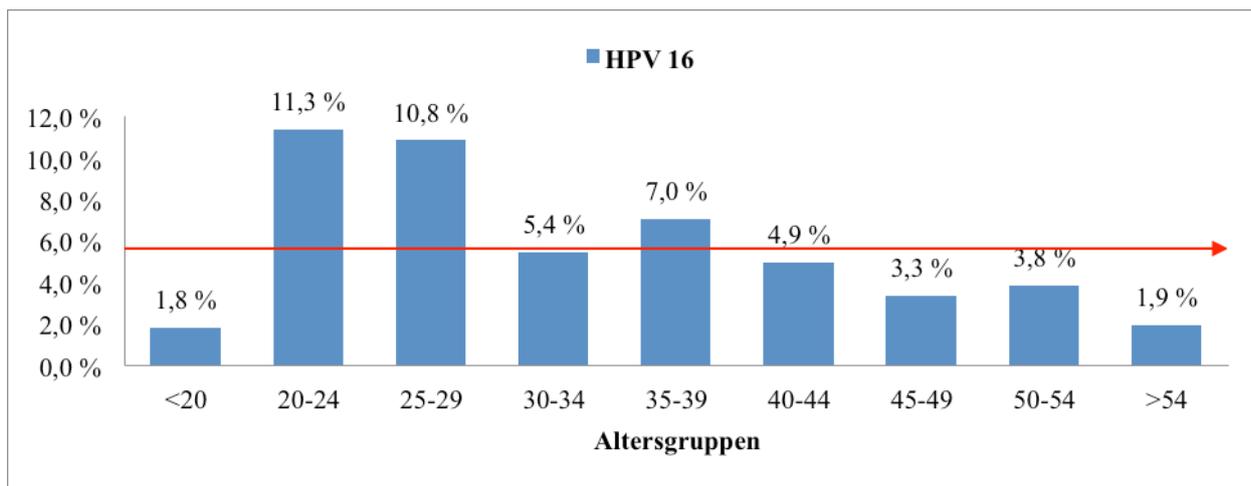


Abbildung 14: Altersverteilung HPV 16. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 5,6 % (roter Pfeil).

Ein Gipfel von HPV Subtyp 18 zeigt sich deutlich im Alter zwischen dem 25. und 34. Lebensjahr (13,6 % und 11,7 %). Auch hier lässt sich ein zweiter Gipfel beobachten (7,8 %), welcher im Vergleich zu HPV Subtyp 16 um etwa 5 Jahre verschoben zwischen dem 40. und 44. Lebensjahr liegt. Im weiteren Altersverlauf bleibt die Inzidenz von HPV Subtyp 18 unter 5 % (Abb. 15).

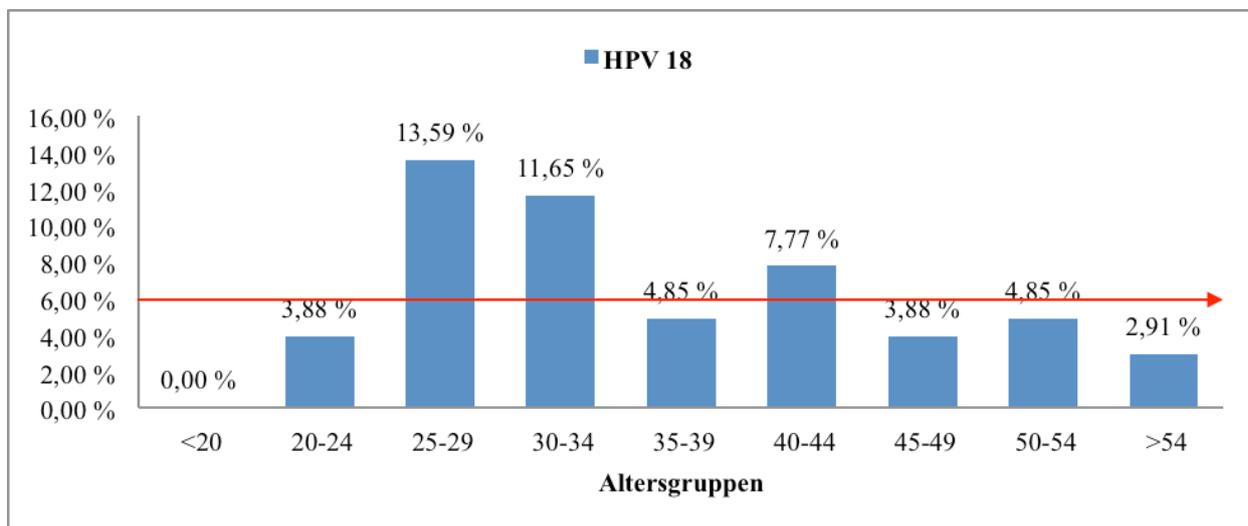


Abbildung 15: Altersverteilung HPV 18. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 5,9 % (roter Pfeil).

HPV Subtyp 31 dagegen zeigt einen späteren Anstieg seiner Inzidenz zwischen dem 30. und 34. Lebensjahr (15,5 %). Seinen Gipfel erreicht er sogar erst zwischen dem 35. und 44. Lebensjahr (24,3 % und 21,4 %). Danach verschwindet er fast mit unter 3 %, wobei sich im Alter von über 54 Jahren wieder eine Inzidenz von etwa 10 % ergibt (Abb. 16).

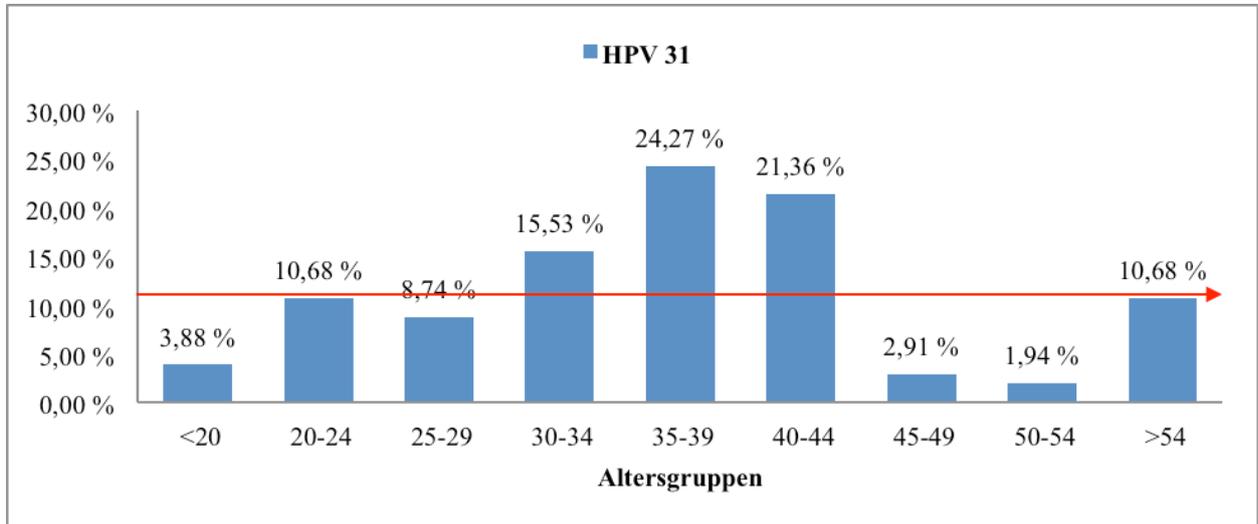


Abbildung 16: Altersverteilung HPV 31. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 11,1 % (roter Pfeil).

Auch HPV Subtyp 45 zeigt seinen Gipfel ab dem 30. Lebensjahr (12,6 %). Dieser hält sich jedoch über einen längeren Zeitraum von ca. 14 Jahren bis zum 44. Lebensjahr (9,7 %). Bei den unter 20-Jährigen konnte er gar nicht nachgewiesen werden und auch im Alter zwischen 20 und 29 Jahren bleibt er bei unter 5 %. Im späteren Altersverlauf dagegen mit einer Ausnahme zwischen dem 50. und 54. Lebensjahr hält er sich mit einer Inzidenz von über 5 % (Abb. 17).

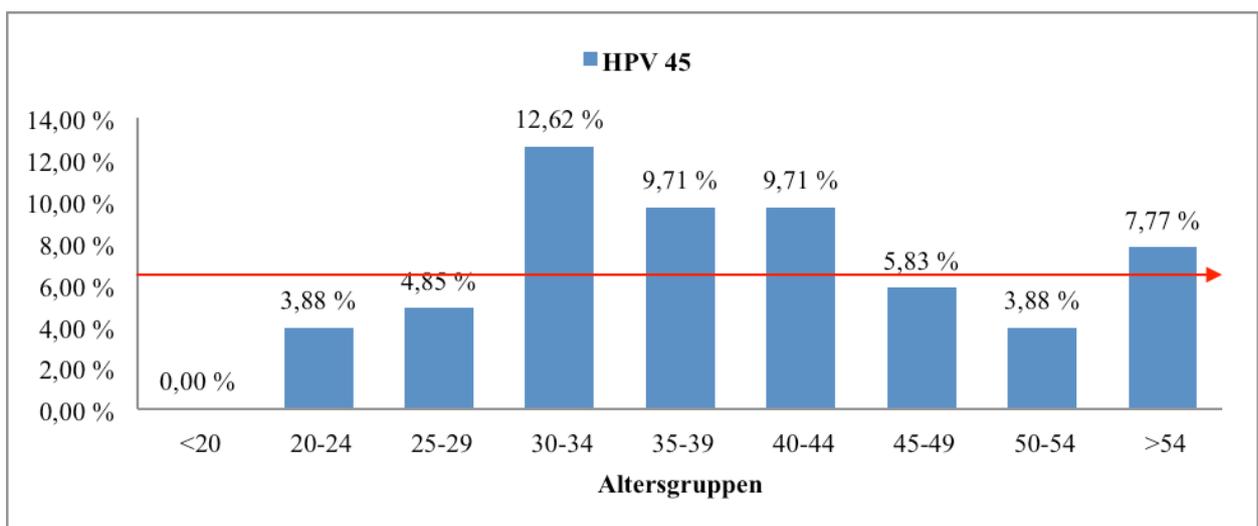


Abbildung 17: Altersverteilung HPV 45. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 6,5 % (roter Pfeil).

HPV Subtyp 51 zeigt einen vergleichsweise frühen Gipfel zwischen dem 20. und 24. Lebensjahr. Anschließend hält er sich bis zum 44. Lebensjahr weitgehend konstant in einem Bereich zwischen 8 % und 11 % bis die Inzidenz im Alter von 50 – 54 Jahren auf unter 4 % zurückfällt. Hier ergibt sich bei den über 54-Jährigen eine Inzidenz von immerhin noch fast 7 % (Abb. 18).

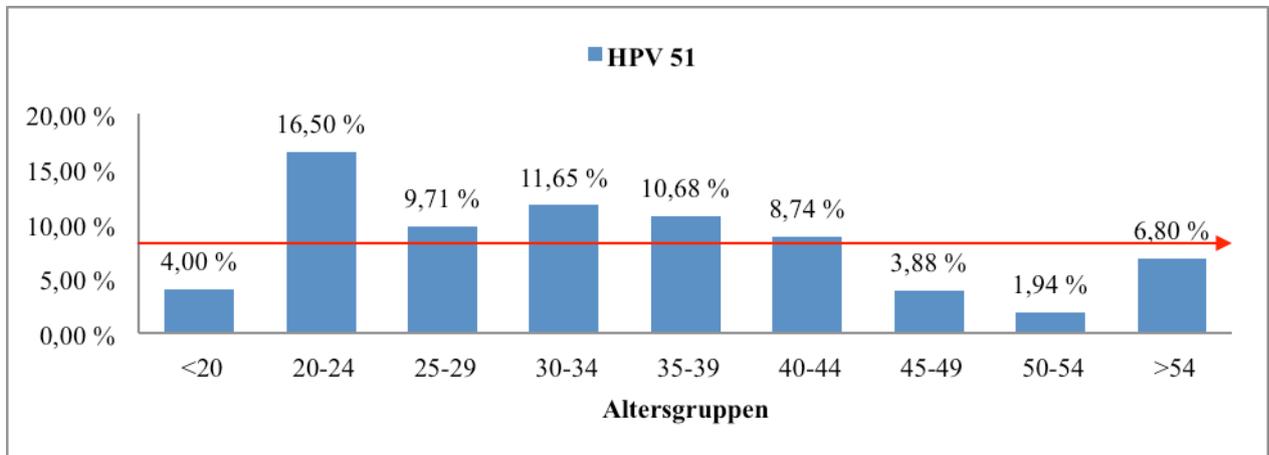


Abbildung 18: Altersverteilung HPV 51. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 8,2 % (roter Pfeil).

HPV Subtyp 66 fällt schon auf den ersten Blick aus dem Rahmen. Hier zeigt sich bei den unter 20-Jährigen eine verschwindend geringe Inzidenz von etwa 3,5 %. Ab dem 20. Lebensjahr steigt diese jedoch auf 11,6 % und hält sich kontinuierlich bis zum 39. Lebensjahr zwischen 8,7 % und 11,7 %. Zwischen dem 40. und 44. Lebensjahr kommt es jedoch zu einer weiteren Steigerung der Inzidenz auf 13,6 %, welche sich dann zwischen dem 45. und 54. Lebensjahr wieder zurückzieht (5,8 % und 3,9 %). Besonders auffällig hier ist der tatsächliche Gipfel im Alter über 54 Jahren. Dieser ist zwar kumulativ bei den über 54-Jährigen gemessen, zeigt jedoch mit 16,5 % die höchste Inzidenz des HPV Subtyp 66 überhaupt. Im Vergleich zu allen bisher untersuchten HPV-Subtypen ist dieser also der einzige, der seinen Gipfel im Alter vorzuweisen hat (Abb. 19).

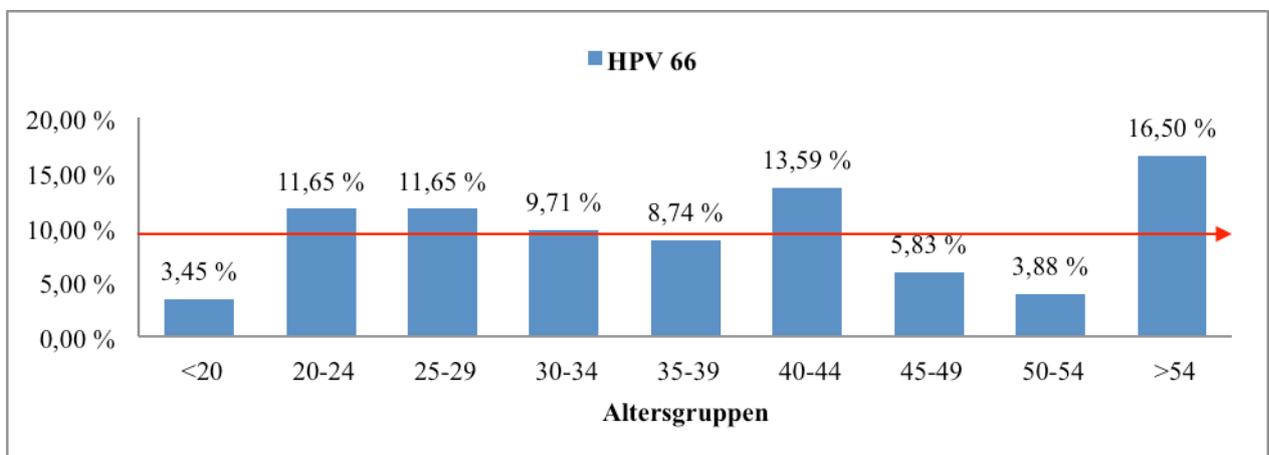


Abbildung 19: Altersverteilung HPV 66. Die durchschnittliche Prävalenz lag bei 9,4 % (roter Pfeil).

5.5 Vergleich zur Studie von 1997³⁸

Da noch die Originaldaten der Studie von 1997 zugänglich waren, wurden die Ergebnisse der beiden Studien verglichen. Natürlich bestanden methodische Unterschiede. So wurden 1997 wie auch 2006-8 der HPV Nachweis mit einer PCR unter Verwendung derselben Primer in einem vergleichbaren Mastermix durchgeführt. 1997 wurden die Subtypen allerdings durch Membranhybridisierung im Dot-Plot Verfahren identifiziert. Dabei wurden andere Sonden eingesetzt als beim 2006-8 verwendeten Lipaassay und es konnten nur die HPV-hr Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39 und 58 sowie die HPV-lr Typen 6 und 11 zusammengefasst mit einer Mischreaktion erkannt werden.

Untersucht wurden in der Studie von 1997 insgesamt 5022 Frauen, die anlässlich einer Krebsfrüherkennungsuntersuchung (KFU) auf eine HPV Infektion und eine Infektion mit Chlamydia trachomatis getestet wurden. Zusätzlich wurden Daten zur Sexualität, dem sozialen Status und Krankenkassenzugehörigkeit erfasst. Von den 1997 beteiligten 40 Praxen waren 22 in die 2006-2008 durchgeführten Untersuchungen eingebunden.

Die Prävalenz für HPV betrug 1997 19,7 % bezogen auf alle Altersgruppen. 2006-8 war die ermittelte Prävalenz von Frauen mit einem positiven HPV Nachweis 25,1 %. Um der Frage näher zu kommen, ob dieser Anstieg methodische Ursachen hatte oder durch die Art der Auswahl der untersuchten Frauen als systematischer Fehler anzusehen war, wurden die Daten gegenübergestellt und verglichen (Tab. 5).

Obwohl die Gesamtprävalenz für eine HPV Infektion in der Folgestudie von 2008 gestiegen war, war dieser Anstieg nicht einer Zunahme der HPV Typen 16 und 18 geschuldet. Auch bei den HPV-hr Typen 31, 33 und 58 konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Bei den Prävalenzen von HPV 39 und 35 war sogar ein signifikanter Rückgang zu verzeichnen. Dass beim Nachweis der HPV-hr Typen eine signifikante Zunahme von 14 % auf 16,1 % beobachtet werden konnte, ist auf die 1997 nicht separat bestimmten Typen 66, 51, 45, 68, 52 und 56 zurückzuführen. Die 1997 nachgewiesenen Infektionen mit HPV 6 und 11 lagen um das Dreifache über der 2008 ermittelten Prävalenz. Dabei kam HPV Subtyp 11 kaum noch eine Bedeutung zu. Dagegen hatte die Gruppe der anderen HPV-lr Typen deutlich an Prävalenz zugelegt. Die Zunahme der HPV Nachweise betraf vor allem die 1997 mit dem damaligen Test nicht erfassten HPV-hr und HPV-lr Typen sowie nicht klassifizierbare Typen.

HPV Typ	1997 Anzahl 5022	%	2008 Anzahl 4000	%	Odds Ratio	P-Wert
16	261	5,2	220	5,5	0,94	0.55
31	146	2,9	103	2,6	1,13	0.37
33	80	1,6	49	1,2	1.3	0.15
39	65	1,3	32	0,8	1,6 (1,06-2,48)	0.024
18	55	1,1	42	1,01	1.04 (0,69-1,56)	0.91
58	50	1,0	53	1,33	0,75 (0,50-1,10)	0.17
35	45	0,9	6	0,15	6,0 (2,56-14.1)	0.000
HPV-hr	703	14,0	644	16,1	0,83 (0,76-0,95)	0.005
6/11	181	3,6	64	1,6	2,3 (1,7-3,07)	0.000
Nk	106	2,1	185	3,7	0,56 (0,44-0,71)	0.000
		19,70				

Tabelle 5: Vergleich der HPV-Prävalenz der Subtypen der Studie von 1997 und 2008.

6 Diskussion

Im Allgemeinen wird eine HPV Infektion erst nach der Geschlechtsreife im frühen Erwachsenenalter erworben. Dabei finden sich die höchsten Prävalenzen bei Frauen im mittleren Lebensalter zwischen 35 und 45 Jahren. Außerdem liegen Unterschiede der Prävalenzen entsprechend der geographischen Lage der untersuchten Bevölkerungsgruppe vor. Verschiedene Studien lassen in Afrika und Nord- sowie Südamerika Prävalenzen von ~20 % erwarten, während in Süd- und Nordeuropa ~15 % beobachtet werden.³⁹ Die in Berlin untersuchten Frauen waren zu 74,9 % HPV negativ und zu 25,1 % HPV positiv. Damit entsteht ein erheblicher Erklärungsbedarf, denn selbst in der zehn Jahre zuvor durchgeführten Bundesministerium für Gesundheit (BMG) Studie war nur 19,2 % Gesamtprävalenz einer HPV Infektion ermittelt worden. Grundsätzlich wären Durchschnittsprävalenzen um 15 % zu erwarten. Davon haben allerdings nur 60 % serologische Anzeichen einer HPV Infektion. Die lebenslange Infektionswahrscheinlichkeit beträgt 75 %.⁹

Da die durchschnittliche Infektionsdauer einer HPV Infektion 8-18 Monate beträgt, sind die meisten aller Infektionen nach zwei bis drei Jahren nicht mehr nachzuweisen.^{9, 40-43}

Nun zeigen die Ergebnisse eines sehr deutlich: Wenn bei derartigen Untersuchungen die Altersgruppen von 25-35 überrepräsentiert sind, sind höhere Prävalenzen der HPV-hr und -lr Typen zu erwarten. Werden diese Untersuchungen im Zusammenhang mit einer Krebsfrüherkennungsuntersuchung durchgeführt, können hier mehr Fälle von Patientinnen mit einer Dysplasie vorkommen. Das kann sowohl in der Studie von 1997 als auch in den hier vorgestellten Untersuchungen von 2008 angenommen werden. Dennoch erstaunt, dass die HPV-hr Typen 16 und 18 mit vergleichbaren Prävalenzen in beiden Untersuchungen vertreten sind. Diese scheinen sich über zehn Jahre nicht wesentlich verändert zu haben. Da die Zunahme der Prävalenz vor allem der in der damaligen Zeit noch nicht, aber heute erkennbaren HPV Typen der HPV-hr und -lr Typen geschuldet ist, müssen auch methodische Unterschiede in Erwägung gezogen werden, obwohl in der primären PCR die gleichen Primer und der gleiche Mastermix eingesetzt wurden.

Gerade bei den Mehrfachinfektionen kann in dem hier verwendeten Lipaassay durchaus über Kreuzreaktionen die eine oder andere Bande mehr auftauchen. Hier kommen natürlich auch die Auswahlkriterien der Patientinnen ins Feld. In der hier vorgestellten Studie wurden Patientinnen aufgenommen, die entweder privat versichert waren oder als Selbstzahler den Test anforderten.

Das ist eine völlig andere Struktur als bei der Vorläuferstudie von 1997. Dass die aus heutiger Sicht impfrelevanten Typen relativ vergleichbar abgebildet werden erstaunt jedoch nicht, denn in der Studie von 1997 fanden sich keine Unterschiede bei der Verteilung der HPV Infektion zwischen Privatpatientinnen und Kassenpatientinnen.

Natürlich sollte nicht die Sexualität unbeachtet bleiben. Es gibt kulturelle Unterschiede. Berlin ist eine Stadt ständiger Migration, aber ob die Berliner Bevölkerung im Vergleich zur weltweiten Durchschnittsbevölkerung sexuell aktiver bzw. eine höhere Partnerfluktuation hat,^{44, 45} bleibt sehr zu bezweifeln. Insgesamt zeigte sich jedoch, dass die Auswertung von Labordaten der HPV Infektionen im Rahmen der Krebsfrüherkennungsuntersuchung durchaus eine akzeptable und vor allem kostengünstige Alternative zur Erfassung der aktuellen Prävalenzen der HPV Infektionen bilden kann. Sie bietet sich damit als Monitoring zur Feststellung der Auswirkung einer Impfung an.

Deutschlandweit, weltweit sowie in der durchgeführten Studie trat der HPV-hr Subtyp 16 am häufigsten auf. Diese Tatsache ist seit etwa zehn Jahren belegt und lässt auf einen kausalen Zusammenhang schließen. Dieser Subtyp wird für über die Hälfte aller Zervixkarzinome verantwortlich gemacht.^{46, 47} Wie zu erwarten waren die Berliner Frauen am häufigsten mit 34 % positiv auf HPV-hr Subtyp 16. Vergleicht man die Inzidenzen mit der Kontrollgruppe aus der Arbeit von Castellsague et al, so tritt HPV-hr Subtyp 16 bei 34,6 % der untersuchten Patientinnen auf.⁴⁸ In derselben Arbeit konnten Castellsague et al nachweisen, dass bei Patientinnen, die bereits an einem Zervixkarzinom erkrankt waren, 52,1 % einen auf HPV-hr Subtyp 16 positiven Befund hatten. Diese Ergebnisse können ebenfalls aus der Arbeit von Bosch et al untermauert werden.²⁶

Der in der Literatur am zweithäufigsten auftretende HPV-hr Subtyp 18 war bei den Berliner Frauen am sechsthäufigsten mit 9 % vertreten. Bis zu 20 % aller Zervixkarzinome werden dem HPV-hr Subtyp 18 zugeordnet.^{46, 47} In anderen Arbeiten zeigt HPV-hr Subtyp 18 eine Prävalenz von 12 % und bei bereits an einem Zervixkarzinom erkrankten Frauen eine Prävalenz von 39 %.

Auffällig ist, dass bei Frauen die bereits an einem Zervixkarzinom erkrankt waren, ein signifikant gehäuftes Vorkommen der malignen HPV-Subtypen 16 und 18 zu beobachten war.

Der HPV-hr Subtyp 45 war bei den Berliner Frauen mit 9 % vertreten, dieser korreliert mit den 7,1 % in unserer Vergleichsstudie. Bei den Patientinnen mit bereits aufgetretenem Zervixkarzinom fällt auf, dass es keinen Anstieg an HPV-hr Subtyp 45 gibt (6,2 %).

Weitere HPV Virus Subtypen, wie 59 waren mit 4 % vertreten im Vergleich zu 1,1 % bei gesunden Frauen und 3,4 % bei Zervixkarzinom-Patientinnen, Subtyp 35 war mit 1 % im Vergleich zu 3,8 % und 2,1 %, Subtyp 33 war mit 8 % im Vergleich zu 3 % und 2,1 %, Subtyp 31 war mit 16 % im Vergleich zu 5,6 % und 0,7 %, Subtyp 58 war mit 8 % im Vergleich zu 4,9 % und 0,7 % sowie Subtyp 51 war mit 12 % im Vergleich zu 1,9 % bei gesunden Frauen und 0,7 % bei Zervixkarzinom-Patientinnen vertreten.⁴⁸

Insgesamt ist zu beobachten, dass die Berliner Frauen sich bei Subtyp 33, 31 und 51 deutlich von den Zahlen der Vergleichsstudie unterscheiden.

In der Vergleichsstudie hat der Autor drei regionale Infektionsverteilungen vorgestellt, aus denen hervorgeht, dass die HPV Prävalenzen regionale Unterschiede aufweisen.⁴⁸

HPV-lr Infektionen sind erfahrungsgemäß verantwortlich für genitale Warzen insbesondere Condylomata acuminata.⁴⁹ Hierbei spielen HPV-lr Subtypen 6, 11, 40, 42 und 61 eine übergeordnete Rolle. In der sexuell aktiven Bevölkerung zwischen 15 und 49 Jahren sind zwischen 1-2 % von Condylomata acuminata betroffen, welche in ca. 30 % spontan abheilen.^{49, 50}

Der am häufigsten vertretene HPV-lr Subtyp bei den Berliner Frauen ist der Subtyp 53. Bei genauer Literaturrecherche ergab sich kein Anhalt auf das gehäufte Auftreten dieses Subtypen. Aufgrund der immer sensibler werdenden Untersuchungsverfahren ist anzunehmen, dass in vielen vergangenen Studien der erwähnte Subtyp nicht isoliert worden ist, jedoch unter Umständen vorhanden war.

Die HPV-lr Subtypen 70 und 54 waren in der Studie zu je 23 % vertreten. Untersucht man die Literatur, so findet man das Auftreten des Subtyps 70 bei dermatologischen Infektionserkrankungen.⁴⁹ In neueren Arbeiten, bei denen aller Wahrscheinlichkeit nach die labortechnischen Möglichkeiten sensitiver waren, tritt der Subtyp 70 insbesondere bei Zervixkarzinom-Patientinnen gehäuft auf.⁸ Subtyp 54, welcher gehäuft für Condylomata acuminata verantwortlich ist, konnte in älteren Arbeiten nur selten isoliert werden.

Die wohl interessantesten HPV-lr Subtypen 6 und 11 kommen zu jeweils 17 % und 1 % vor. Aufgrund der bis dato entwickelten Impfstoffe ist es möglich, Patientinnen durch eventuelle Kreuzreaktionen gegen morphologisch ähnliche Subtypen zu impfen.

Die HPV-lr Subtypen 6 und 11 als impfbare lr Subtypen treten in den meisten Fällen bei Condylomata acuminata auf, werden jedoch auch beim Zervixkarzinom sowie seinen Vorstufen (CIN 1-3) als auch bei dermatologischen, urologischen sowie Hals-Nasen-Ohren (HNO) Tumoren beobachtet.⁵¹

HPV-lr Subtypen sind nachweislich verantwortlich für anogenitale Condylomata und Larynxpapillome. Rezidivierende Larynxpapillome sind lebensbedrohlich und gehen daher mit multiplen chirurgischen Eingriffen einher.

HPV-lr Subtypen sind jedoch auch bei Zervixkarzinom-Patientinnen sowie Patienten mit anogenitalen Karzinomen und Atemwegskarzinomen nachgewiesen.^{26, 52}

Dies wirft die Frage auf, welche Umstände eine HPV-lr assoziierte Onkogenese fördern. Aufgrund dieser Tatsachen bekommt die quadrivalente Impfung eine wichtigere Bedeutung, hinsichtlich wirtschaftlicher Gesichtspunkte. Rezidivierende Larynxpapillome sowie anogenitale Condylomata verursachen bei wiederholtem Auftreten hohe Kosten. Um den Vorteil der quadrivalenten Impfung in bevölkerungsbasierten Impfprogrammen nachzuweisen, sind kosteneffektive Analysen notwendig.⁵³

Auffallend an der Altersverteilung der HPV-lr Subtypen war im Vergleich zu den HPV-hr Subtypen die abnehmende Tendenz mit zunehmendem Alter. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus der Literatur überein.⁵⁴

Wie in der Literatur beschrieben fällt bei Betrachtung der Datenbank auf, dass sich das höchste Vorkommen im Alter zwischen 20 und 29 Jahren zeigt, es danach jedoch nur langsam bis zum 44. Lebensjahr abfällt. Das häufigste Auftreten liegt mit 18 % bei den 25-29 Jährigen. Teilt man die Altersgruppen in <30 und >30 Jahre, so bemerkt man, dass in der Gesamtverteilung aller HPV-hr Subtypen in der Gruppe der >30 Jährigen ein höheres Vorkommen besteht. In der Literatur ist jedoch das Gegensätzliche zu beobachten: Die ausgewerteten Daten zeigten ein Verhältnis von 16 % gegen 8,5 % zugunsten der älteren Frauen.¹⁷

Ein nicht unwesentlich zu beobachtendes Ereignis ist, dass generell ältere Frauen (>30 Jahre) eher an einem Zervixkarzinom erkranken.^{26, 55, 56} Bereits Bosch und Kollegen konnten in einem 2002 erschienenen Review belegen, dass sich das invasive Zervixkarzinom bei Frauen typischerweise ab der dritten Lebensdekade entwickelt. Eine zweite HPV Prävalenz wurde bei Frauen ab 50 Jahren beobachtet.^{26, 57, 58}

Die HPV-hr Prävalenz ist altersabhängig mit der stärksten Korrelation zwischen HPV-hr Positivität und Krankheit bei älteren Frauen, die wahrscheinlich am ehesten vom zusätzlichen HPV-Nachweis im Rahmen der Krebsvorsorgeuntersuchung profitieren.¹⁷

In der Literatur fanden sich keine relevanten Unterschiede in der Verteilung der HPV Subtypen (als Einzel- oder Mischinfektionen). Nur die Prävalenz von HPV-hr Subtyp 16 nahm mit dem Alter signifikant ab. Zunehmende Prävalenz mit dem Alter wurde bei den Subtypen 39, 52 und 58 beobachtet.¹¹

Eine weitere Studie aus England, bei der ein Patientenkollektiv von 11.085 Frauen eingeschlossen war, berücksichtigt nur die Frauen >30 Jahren. In dieser Arbeit zeigte sich eine konsequente Abnahme an HPV Infektionen mit zunehmendem Alter.⁵⁹ Vergleicht man die Ergebnisse aus dieser Arbeit mit Abbildung 5 so sieht man ein ähnliches Korrelat in der mit dem Alter abnehmenden Tendenz. Die 11.085 englischen Frauen waren im Durchschnitt um 5,5 % weniger HPV-hr positiv als in unserer Studie.

Der mit maligner Potenz und am häufigsten vertretene HPV-hr Subtyp 16 zeigt sowohl bei Patientinnen zwischen 20 und 30 Jahren als auch bei Patientinnen von 35 bis 39 Jahren einen deutlichen Gipfel, während er in der Literatur als im Alter stetig abnehmend beschrieben wird (s.o.). Der ebenfalls mit maligner Potenz HPV-hr Subtyp 18 zeigt eine Zweigipfeligkeit, welche jedoch bei deutlich weniger Frauen auftritt. Ein erster Gipfel zeigt sich im Alter von 25 bis 35 Jahren und der zweite im Alter zwischen 40 und 44 Jahren. In der Arbeit vom Muñoz et al ist der HPV-hr Subtyp 18 in der Kontrollgruppe bei den <34-Jährigen Patientinnen gar nicht vorhanden und in der Gruppe der >35-Jährigen konstant bei 12 %.¹¹

Das geringere Auftreten von HPV Subtyp 18 im Vergleich zu HPV Subtyp 16 korreliert mit der Tatsache, dass das Zervixkarzinom häufiger als Plattenepithelkarzinom auftritt.

Betrachtet man die Alterverteilung von HPV-hr Subtyp 16 (Abb. 14), so erkennt man neben dem Gipfel zwischen 20 und 29 Jahren einen zweiten Gipfel zwischen 35 und 39 Jahren sowie ein langsames Abnehmen bis zum 49. Lebensjahr. Bei möglichen Erklärungsversuchen der rezidivierend auftretenden Zweigipfeligkeit einiger HPV-hr Subtypen kann man eine Parallele zum Scheidungsregister der Bundesrepublik Deutschland erkennen. Laut dem Bundesamt für Statistik lassen sich 2,6 pro 1000 Einwohnerinnen scheiden. Diese haben ein durchschnittliches Alter von 38,9 Jahren.⁶⁰ Im Vergleich nun zur Abbildung 14 korreliert dieses Alter mit dem zweiten Gipfel des HPV-hr Subtyps 16.

Eine Ursache für die hohe Infektionsrate in dieser Altersgruppe könnte eine erneute Partnerfluktuation sein, welche eher in den jungen Altersgruppen zu erwarten wäre. Als weitere Möglichkeit käme die unter Umständen reduzierte Immunität bei Frauen >35 Jahren in Betracht.¹⁴ Bei immunsupprimierten Patientinnen (HIV Patientinnen) im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung ergibt sich eine 42 prozentige höhere Wahrscheinlichkeit für eine Mischinfektion.^{9, 30, 31} In allen berücksichtigten Studien variiert das Risiko bei Mischinfektionen nicht signifikant vom Risiko bei Einzelinfektionen.⁶¹

Legt man ein Augenmerk auf die Misch- und Einzelinfektionen, so sieht man ein häufigeres Vorkommen eines HPV-hr Subtyps 16 (4,3 %) oder 18 (0,9 %) als Einzelinfektion oder Kombination mit einem weiteren HPV-hr Subtypen, während nur 1,2 % (Subtyp 16) bzw. 0,5 % (Subtyp 18) der Frauen eine Kombination aus HPV-hr Subtypen 16 und 18 oder einen HPV-hr Subtypen haben. Bei HPV-hr Subtyp 6 und 11 sehen die Ergebnisse folgendermaßen aus: 0,8 % bei HPV-hr Subtyp 6 und 0,03 % bei HPV-hr Subtyp 11 hatten eine Einzelinfektion. 0,7 % der HPV-hr Subtyp 6 sowie 0,1 % der HPV-hr Subtyp 11 infizierten Frauen hatten eine Mischinfektion mit einem HPV-hr Subtypen. In der Literatur waren 92 % mit einem einzelnen HPV-Subtypen sowie 8 % mit multiplen Subtypen infiziert.¹¹

In der Multicenter-Studie von Bosch et al wurden bei 2 % der Patientinnen multiple HPV Typen nachgewiesen, welche jedoch kein signifikant erhöhtes Risiko im Vergleich zu den Frauen mit Einzelinfektionen zeigten.²⁶

In Anbetracht dieser Tatsachen ist der Nutzen des quadrivalenten Impfstoffes (Gardasil®) zu diskutieren. Generell wird angenommen, dass auch ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Infektion mit Humanen Papillomaviren und einer Subgruppe von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs als gesichert gilt.⁹ Die Vakzine gegen die HPV-hr Subtypen 6 und 11 sollten nicht nur eine sehr hohe Effektivität gegen Genitalwarzen zeigen, sondern auch gegen Papillomatosen, welche rezidivierend Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereichs verursachen. Risikofaktoren, wie sexuelle Promiskuität und früher sexueller Kontakt sind für HPV positive Oropharynxkarzinome mit denen des Zervixkarzinoms vergleichbar und werden als sexuell übertragbare Erkrankungen angesehen.^{9, 50, 62, 63}

Solche Therapieansätze gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht. In der Literatur sind vereinzelte Studien von prophylaktischen Impfungen mit „intention-to-treat“ zu finden. Arbeitsgruppen wie die PATRICIA Study Group, die Future II Study Group, sowie die HPV-Vaccine Study Group

haben einheitlich in ihren groß angelegten Studien eine nachweisliche Effektivität beider existierender Impfstoffe gegen die HPV-hr Subtypen 16 und 18 bewiesen.^{1, 34, 64, 65}

In einer Arbeit der Future II Study Group konnte in der Kohorte der primär HPV negativen sowie HPV positiven Frauen eine Effektivität von 44 % mit „intention-to-treat“ nachgewiesen werden und bei einem sekundären Ansatz mit „intention-to-treat“ bei primär HPV positiven Frauen eine Reduktion der CIN2/3 und AIS von 18 % belegt werden.¹

Betrachtet man weitere Studien der besagten Arbeitsgruppen, ist es nicht möglich gewesen deutliche Nachweise für primäre Therapieansätze durch HPV Impfungen zu bieten. Somit gibt es keine überzeugende Datenlage, die für eine Empfehlung der therapeutischen Impfung bei bereits HPV-hr Subtypen 16 und 18 positiven Frauen spricht.

Eine Interims Studie der PATRICIA Study Group hat zwischen zwei Kohorten (HPV geimpft und Hepatitis A geimpft) nachgewiesen, dass bei insgesamt 23 HPV-hr Subtypen 16/18 positiven Patientinnen zwei Frauen aus der HPV Kohorte und 21 Frauen aus der Hepatitis Kohorte eine CIN2+ in Verbindung mit HPV-hr Subtyp 16/18 entwickelt haben. Die Impfeffektivität gegen CIN2+ in Verbindung mit HPV-hr Subtypen 16/18 lag bei 90,4 %.

Die beiden Kohorten der besagten Studie sind vergleichbar mit den 4000 Berliner Patientinnen.

Eine weitere wichtige Erkenntnis geht ebenfalls aus einer Studie der erwähnten Arbeitsgruppe hervor. Nach Auswertung zweier PATRICIA-Studien zeigte das bivalente Vakzin gegen die HPV-hr Subtypen 16/18 eine kreuzprotektive Effektivität gegen vier weitere onkogene HPV-hr Subtypen, nämlich 33, 31, 45 und 51.^{35, 65} Ähnliche Erkenntnisse, die HPV-hr Subtypen 31 und 45 betreffend, wurden ebenfalls durch die Arbeitsgruppe HPV-Vaccine Study Group belegt.⁶⁴

In allen drei aufgeführten Studien wurden alle Kohorten als Kollektiv untersucht und waren somit vergleichbar mit den 4000 untersuchten Berliner Frauen. Unter diesen hatten 16 % einen HPV-hr Subtyp 31, 8 % eine HPV-hr Subtyp 33, 9 % einen HPV-hr Subtyp 45 und 12 % einen HPV-hr Subtyp 51. Die bereits ausführlich diskutierten malignen HPV-hr Subtypen 16 und 18 waren unter den infizierten Frauen mit 34 % und 9 % vertreten. Betrachtet man alle impfsensiblen onkogenen Subtypen in ihrer Gesamtheit, so machen diese kumulativ 69,8 % aller 644 HPV-hr infizierten Berliner Frauen aus.

Anhand dieser sehr deutlichen Ergebnisse lässt sich die bereits bestehende Empfehlung der Ständigen Impfkommission (STIKO) für eine prophylaktische Impfung für alle Mädchen von 12 bis 17 Jahren aussprechen. Über dieses Alter hinaus liegt eine Impfung laut STIKO in der Entscheidung der Frau und ihres behandelnden Arztes, da aufgrund der aktuellen Datenlage eine „intention-to-treat“ noch nicht ausreichend nachgewiesen werden konnte.

Länder wie z.B. Belgien oder Schweden haben Schulimpfprogramme, wo durch die Erreichbarkeit in der Schule hohe Impfquoten erzielt werden können. In Deutschland werden die Impflinge nur bei einem aktiven Arztbesuch erreicht, so dass von der STIKO eine höhere Altersspanne als in diesen Ländern empfohlen wird, um entsprechend hohe Impfquoten zu erreichen. Die STIKO hat in ihrer Begründung auf fehlende Daten hingewiesen, welche bereits erhoben und in naher Zukunft veröffentlicht werden.⁶⁶

7 Literaturverzeichnis

1. Ault KA. Effect of prophylactic human papillomavirus 11 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;369:1861-1868
2. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer*. 2002;97:72-81
3. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (ibsc) study group. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:796-802
4. Schiffman MH. Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;186:55-81
5. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Munoz N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K1-16
6. Stoler MH. A brief synopsis of the role of human papillomaviruses in cervical carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;175:1091-1098
7. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189:12-19
8. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121:621-632
9. Albers AE, Hoffmann TK, Klussmann JP, Kaufmann AM. [prophylactic and therapeutic vaccines against human papilloma virus]. *HNO*. 58:778-790
10. Broker TR. Structure and genetic expression of papillomaviruses. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1987;14:329-348

11. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518-527
12. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated pcr and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 1995;33:901-905
13. zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:427-447
14. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324:17-27
15. Moscicki AB. Genital human papillomavirus infections. *Adolesc Med.* 1990;1:451-470
16. Cuzick J, Beverley E, Ho L, Terry G, Sapper H, Mielzynska I, Lorincz A, Chan WK, Krausz T, Soutter P. Hpv testing in primary screening of older women. *Br J Cancer.* 1999;81:554-558
17. Petignat P, Faltin D, Goffin F, Billieux MH, Stucki D, Sporri S, Vassilakos P. Age-related performance of human papillomavirus testing used as an adjunct to cytology for cervical carcinoma screening in a population with a low incidence of cervical carcinoma. *Cancer.* 2005;105:126-132
18. Schmitt HJ KA, Schneider A. Should all women be vaccinated against hpv? *Pol Arch Med Wewn.* 2007;117:448-451
19. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Gilkison G, Arends MJ, Graham C, McGoogan E. Persistent high risk hpv infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. *J Clin Pathol.* 2005;58:946-950
20. Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, Hallmans G, Dillner J. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med.* 1999;341:1633-1638

21. Rozendaal L, Walboomers JM, van der Linden JC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Helmerhorst TJ, van Ballegooijen M, Meijer CJ. Pcr-based high-risk hpv test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytomorphologically normal cervical smears. *Int J Cancer*. 1996;68:766-769
22. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998;338:423-428
23. Bosch FX, Munoz N, de Sanjose S, Navarro C, Moreo P, Ascunce N, Gonzalez LC, Tafur L, Gili M, Larranaga I, et al. Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade iii/carcinoma in situ: A case-control study in spain and colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1993;2:415-422
24. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population-based case-control study in colombia and spain. *Int J Cancer*. 1992;52:743-749
25. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, Suntum M, Bock JE, Poll PA, Meijer CJ. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (hpv) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: Population based prospective follow up study. *BMJ*. 2002;325:572
26. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55:244-265
27. Bosch FX, de Sanjose S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*. 2007;23:213-227
28. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:958-964
29. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: Incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*. 2003;157:218-226

30. Sillman FH, Sentovich S, Shaffer D. Ano-genital neoplasia in renal transplant patients. *Ann Transplant.* 1997;2:59-66
31. Ferenczy A, Coutlee F, Franco E, Hankins C. Human papillomavirus and hiv coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: A review of recent developments. *CMAJ.* 2003;169:431-434
32. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis.* 2000;181:1911-1919
33. Viscidi RP, Schiffman M, Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Bratti MC, Rodriguez AC, Sherman ME, Wang S, Clayman B, Burk RD. Seroreactivity to human papillomavirus (hpv) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent hpv infection: Results from a population-based study in costa rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:324-327
34. Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X, de Carvalho NS, Skinner SR, Harper DM, Hedrick JA, Jaisamrarn U, Limson GA, Dionne M, Quint W, Spiessens B, Peeters P, Struyf F, Wieting SL, Lehtinen MO, Dubin G. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent 11 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: An interim analysis of a phase iii double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;369:2161-2170
35. Wheeler CM, Castellsague X, Garland SM, Szarewski A, Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Teixeira JC, Skinner SR, Jaisamrarn U, Limson G, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, Harper DM, Huh W, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Dubin G, Lehtinen M. 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;13:100-110

36. Joura EA, Garland SM, Paavonen J, Ferris DG, Perez G, Ault KA, Huh WK, Sings HL, James MK, Haupt RM, Future I, Group IIS. Effect of the human papillomavirus (hpv) quadrivalent vaccine in a subgroup of women with cervical and vulvar disease: Retrospective pooled analysis of trial data. *BMJ*. 2012;344:e1401
37. Brotherton JM, Fridman M, May CL, Chappell G, Saville AM, Gertig DM. Early effect of the hpv vaccination programme on cervical abnormalities in victoria, australia: An ecological study. *Lancet*. 2011;377:2085-2092
38. Koch J KR, Schäfer A. Bestimmung der Prävalenz genitaler HPV- und Chlamydia-trachomatis-Infektionen in einem repräsentativen Querschnitt der weiblichen Normalbevölkerung in Berlin. *Infektionsepidemiologische Forschung*. 1997;II:1-7
39. Smith JS, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: A global review. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*. 2008;43:S5-25, S25 e21-41
40. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999;180:1415-1423
41. Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, Tu W, Juliar BE, Breen TE, Fortenberry JD. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis*. 2005;191:182-192
42. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, Darragh TM, Brescia R, Kanowitz S, Miller SB, Stone J, Hanson E, Palefsky J. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr*. 1998;132:277-284
43. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, Coutlee F, Franco EL. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12:485-490
44. Moscicki AB. Hpv infections in adolescents. *Dis Markers*. 2007;23:229-234

45. Collins S, Mazloomzadeh S, Winter H, Blomfield P, Bailey A, Young LS, Woodman CB. High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship. *BJOG*. 2002;109:96-98
46. Levi F, Lucchini F, Negri E, Franceschi S, la Vecchia C. Cervical cancer mortality in young women in europe: Patterns and trends. *Eur J Cancer*. 2000;36:2266-2271
47. Glastetter E, Kaufmann AM. Humoral and cellular immune response in hpv vaccination. *Hautarzt*. 2007;58:493-494, 496-500
48. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: Implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:303-315
49. Hengge UR. Papillomavirus diseases. *Hautarzt*. 2004;55:841-854
50. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*. 1997;102:3-8
51. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: A retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;82:57-68
52. Turazza E, Lapena A, Sprovieri O, Torres CP, Gurucharri C, Maciel A, Lema B, Grinstein S, Kahn T. Low-risk human papillomavirus types 6 and 11 associated with carcinomas of the genital and upper aero-digestive tract. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1997;76:271-276
53. Lacey CJ, Lowndes CM, Shah KV. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous hpv-related conditions: Hpv-6/11 disease. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/35-41
54. Jacobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Verheijen RH, Franssen-Daalmeijer N, Meijer CJ. Distribution of 37 mucosotropic hpv types in women with cytologically normal cervical smears: The age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer*. 2000;87:221-227

55. Hildesheim A, Gravitt P, Schiffman MH, Kurman RJ, Barnes W, Jones S, Tchabo JG, Brinton LA, Copeland C, Epp J, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-income women in Washington, D.C. *Sex Transm Dis.* 1993;20:279-285
56. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Cadell DM, Kurman RJ, Manos MM. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis.* 1993;20:274-278
57. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, Balmaceda I, Greenberg MD, Alfaro M, Burk RD, Wacholder S, Plummer M, Schiffman M. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:464-474
58. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernandez P, Salmeron J, Hernandez M. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer.* 2001;91:412-420
59. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, McGoogan E, Menon U, Terry G, Edwards R, Brooks C, Desai M, Gie C, Ho L, Jacobs I, Pickles C, Sasieni P. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: The Hart study. *Lancet.* 2003;362:1871-1876
60. Statistisches Bundesamt: Ehescheidungen im Zeitraum 1990-2002; <http://www.bmfsfj.de>. 2002
61. Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, Garcia P, Young M, Melnick S, Miotti P, Burk R. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:226-236
62. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: Are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol.* 1999;11:191-199
63. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer.* 2004;108:766-772

64. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent 11 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: Follow-up from a randomised control trial. *Lancet*. 2006;367:1247-1255
65. Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, Jenkins D, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G. Efficacy of human papillomavirus (hpv)-16/18 as04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic hpv types (patricia): Final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. 2009;374:301-314
66. Delere Y. Vaccination strategies against hpv. Recommendations from a european perspective. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2009;52:1065-1068

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Pia Denmark, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Verteilung der genitalen HPV Subtypen in der weiblichen Bevölkerung“ 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

9 Lebenslauf

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

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD. Dr. Dr. Axel Schäfer für die Bereitstellung dieser Arbeit. Danke für die Ruhe, Unterstützung und Geduld bei der Verwirklichung dieser Dissertation.

Besonderer Dank geht an Dr. Ioannis Passaloglou, Kamiar Nader und Lars Golestan für die immer währende Hilfsbereitschaft, Anteilnahme, Mühe und Begleitung während der vergangenen Jahre.

Zudem möchte ich mich bei Gabi Welsch für ihre freundliche und großzügige Hilfsbereitschaft im Labor bedanken.

Ich danke meinen Eltern für ihre endlose Unterstützung, Zuneigung und Zuversicht, ohne die diese Arbeit niemals entstanden wäre.